



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Προσδιορισμός άριστων συνθηκών για παραγωγή
πολυφαινολικών εκχυλισμάτων με τη χρήση μικροκυμάτων, από
φύλλα και καρπούς Ευρωπαϊκής Καστανιάς (*Castanea sativa*) από
την περιοχή της Μελιβοίας.**

**Determination of optimized conditions for the production of
polyphenolic extracts using microwaves, from leaves and fruits of
European chestnut (*Castanea sativa*) from Melivia region**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ



Όνομα: ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΛΑΡΙΣΑ, 2019

Τριμελής Επιτροπή:

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Πετρωτός: Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Περίληψη

Από πολλές μελέτες προκύπτει ότι οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες ευθύνονται για αρκετές σοβαρών ασθένειες όπως ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Ακόμα, έχουν ανακαλυφθεί αρκετά φυτά των οποίων τα εκχυλίσματα φέρουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Μία ομάδα ενώσεων που ανιχνεύονται σε φυτικά εκχυλίσματα και παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι οι πολυφαινόλες. Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου και αναλογίας φυτικού υλικού προς υδατικό διαλύτη, προκειμένου να ληφθούν πολυφαινολικά εκχυλίσματα με την μέθοδο των μικροκυμάτων από φύλλα και καρπούς της καστανιάς (*Castanea sativa*). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μελετήθηκε με τις μεθόδους DPPH και προσδιορίστηκε η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Η στατιστική μέθοδος Box- Behnken χρησιμοποιήθηκε για να ερευνηθεί η επίδραση των λειτουργικών παραγόντων, δηλαδή της θερμοκρασίας εκχύλισης, του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας φυτικού συνολικού προς υδατικό διαλύτη. Υπό βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας, επιτεύχθηκαν τιμές 0,358 και 0,398 mgGAE/gr νωπού φυτικού υλικού όσον αφορά την περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες και 10,176 και 9,89 mg/ml όσον αφορά την ανάλυση DPPH, για τα δείγματα φύλλων και καρπών, αντίστοιχα.

Abstract

From various studies in the literature, it appears that free radicals and oxidative stress are responsible for the appearance of several serious diseases such as cancer and cardiovascular disease. Also, several plants have been discovered whose extracts have antioxidant properties. A category of compounds detected in plant extracts which are responsible for antioxidant properties, are polyphenols. In this context, the optimal conditions of temperature, time and proportion of plant material to aqueous solvent were taken into account in order to obtain extracts using the microwave method from *Castanea sativa* leaves and chestnuts. The antioxidant capacity of the extracts was studied by the DPPH method and the total polyphenol content was determined. The Box-Behnken statistical method was used to investigate the effect of the functional factors, i.e. the extraction temperature, extraction time and the ratio of plant total to aqueous solvent. Under optimized operating conditions, values of 0.358 and 0.398 mgGAE / gr of edible plant material were obtained with respect to the total polyphenolic content, and 10.176 and 9.89 mg / ml for DPPH analysis for leaf and nut samples, respectively.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 ^ο : Θεωρητικό Μέρος.....	3
1.1. Ελεύθερες ρίζες και Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) 3	
1.2. Οξειδωτικό Στρες.....	4
1.3. Αντιοξειδωτικές ουσίες.....	6
1.3.1. Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών.....	7
1.4. Πολυφαινόλες.....	8
1.4.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών.....	10
1.5. Καστανιά (<i>Castanea sativa</i>).....	11
1.5.1. Εκχυλίσματα καστανιάς και αντιοξειδωτική δράση.....	13
1.6. Σκοπός του πειράματος.....	14
Κεφάλαιο 2 ^ο : Υλικά και Μέθοδοι.....	15
2.1. Μέθοδοι και δείγματα.....	15
2.2. Εκχύλιση με μικροκύματα.....	15
2.3. DPPH.....	15
2.4. Προσδιορισμός ολικών πολυφαινολών.....	16
2.5. Στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο Box- Behnken με τη χρήση μικροκυμάτων	16
Βιβλιογραφία.....	17
Ξένη Βιβλιογραφία.....	17
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	21

Κεφάλαιο 1^ο: Θεωρητικό Μέρος

1.1. Ελεύθερες ρίζες και Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

Τα άτομα που σχηματίζουν ένα μόριο συγκρατούνται μεταξύ τους με χημικούς δεσμούς. Ένας χημικός δεσμός μπορεί να δημιουργηθεί: α) με αμοιβαία συνεισφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των ατόμων (ομοιοπολικός), β) με άνιση συνεισφορά των ηλεκτρονίων (πολικός ομοιοπολικός δεσμός) και γ) με μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα άτομο στο άλλο (ιοντικός μη ομοιοπολικός δεσμός). Ένα άτομο με ένα ή περισσότερα αζευγάρωτα ηλεκτρόνια, ορίζεται ως ελεύθερη ρίζα (Μαρμαράς και Λαμπροπούλου- Μαρμαρά, 2005).

Δύο άτομα τα οποία αναπτύσσουν μεταξύ τους ομοιοπολικό δεσμό, μοιράζονται ένα ζεύγος ηλεκτρονίων. Εάν ο δεσμός υποστεί ομολυτική διάσπαση (homolytic fission) κάθε άτομο διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζει μια εξαιρετικά δραστική ελεύθερη ρίζα (free radical) η οποία διαθέτει μονήρες (ασύζευκτο) ηλεκτρόνιο ($A\cdot$, $B\cdot$) (Κλώνης, 2007).



Ελεύθερη ρίζα, όμως, δεν μπορεί να είναι μόνο ένα άτομο, αλλά και οποιοδήποτε μόριο ή ιόν που φέρει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων σθένους και συνεπώς διαθέτει ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε κάποιο τροχιακό. Οι αντιδράσεις ριζών δεν είναι τόσο συνήθεις αλλά, παρότι οι περισσότερες από άποψη ηλεκτρικού φορτίου είναι ουδέτερες, παραμένουν εξαιρετικά δραστικές (McMurry, 2017).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δράσουν είτε δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο είτε αποκτώντας ένα ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, επομένως συμπεριφέρονται ως

οξειδωτικά ή αναγωγικά (Cheeseman and Slater, 1993). Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το κεντρικό άτομο. Έτσι συναντώνται ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το οξυγόνο, το άζωτο, το θείο, τον άνθρακα ή άλλα μόρια.

Η συσσώρευση ελεύθερων ριζών στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αντίδραση με τα διάφορα βιομόρια, προκαλώντας βλάβη στο DNA, το RNA, τα λιπίδια, τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες και, εν συνεχεία, το θάνατο των κυττάρων. Σύμφωνα με τη θεωρία των ελεύθερων ριζών της γήρανσης (Harman, 1956), οι ελεύθερες ρίζες καταστρέφουν τα κύτταρα με την πάροδο του χρόνου. Καθώς το σώμα γηράσκει, χάνει την ικανότητά του να καταπολεμά τις επιδράσεις των ελεύθερων ριζών. Το αποτέλεσμα είναι περισσότερες ελεύθερες ρίζες και περισσότερη βλάβη στα κύτταρα, η οποία οδηγεί σε εκφυλιστικές καταστάσεις, καθώς και "κανονική" γήρανση.

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) είναι ασταθή μόρια που περιέχουν οξυγόνο και αντιδρούν εύκολα με άλλα μόρια. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και ενώσεις που αποτελούν ελεύθερες ρίζες [π.χ. Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot}), Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot}), Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}), Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})] (NCI Dictionary). Η υπερσυσσώρεσή τους στον οργανισμό σχετίζεται με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών και διαταραχών, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνο, γήρανση και διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους (Twiley and Lall, 2014).

Οι ελεύθερες ρίζες και τα ROS προέρχονται είτε από φυσιολογικές βασικές μεταβολικές διεργασίες στο σώμα είτε από εξωτερικές πηγές, όπως η έκθεση σε ακτίνες Χ, το όζον, το κάπνισμα τσιγάρων, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και τα βιομηχανικά χημικά (Bagchi and Puri, 1998). Ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών εμφανίζεται συνεχώς στα κύτταρα ως συνέπεια τόσο των ενζυματικών όσο και των μη-ενζυματικών αντιδράσεων. Οι ενζυματικές αντιδράσεις, οι οποίες χρησιμεύουν ως πηγή ελεύθερων ριζών, περιλαμβάνουν εκείνες που εμπλέκονται στην αναπνευστική αλυσίδα, στη φαγοκυττάρωση, στη σύνθεση των προσταγλανδινών και στο σύστημα του κυτοχρώματος P- 450 (Liu et al., 1999). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν επίσης να σχηματιστούν σε μη-ενζυματικές αντιδράσεις οξυγόνου με οργανικές ενώσεις καθώς και από αντιδράσεις ιονισμού (Lobo et al., 2010).

1.2. Οξειδωτικό Στρες

Το οξειδωτικό στρες προκύπτει ως αποτέλεσμα μιας ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων, συνδέεται με τη βλάβη σε ένα ευρύ φάσμα μοριακών ειδών, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων (McCord, 2000). Βραχυπρόθεσμα οξειδωτικό στρες μπορεί να από λοίμωξη, θερμική βλάβη, τοξίνες και υπερβολική άσκηση. Οι ιστοί που έχουν προσβληθεί από οξειδωτικό στρες εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ενζύμων δημιουργίας ριζών (π.χ., οξειδάση ξανθίνης, λιπογενάση, κυκλοοξυγενάση), φαγοκυττάρων, ελεύθερου σιδήρου ή ιόντων χαλκού ή διαταραχή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα την υπερβολική παραγωγή ROS.

Διάφορες μελέτες και θεωρίες (Ashok and Ali, 1999; Betteridge, 2000; Devasagayam et al., 2004; Valko et al., 2007; Lobo et al., 2010; Alkadi, 2018) έχουν συνδέσει το οξειδωτικό στρες με:

- ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως η νόσος του Alzheimer και άλλες μορφές άνοιας
- καρδιαγγειακές παθήσεις που οφείλονται σε φραγμένες αρτηρίες
- αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις διαταραχές, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο καρκίνος
- καταρράκτη και μείωση της όρασης που σχετίζεται με την ηλικία
- αλλαγές στην εμφάνιση που σχετίζονται με την ηλικία, όπως η απώλεια της ελαστικότητας του δέρματος, οι ρυτίδες, η τριχόπτωση και οι αλλαγές στην υφή των μαλλιών
- τον διαβήτη
- γενετικές εκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Huntington ή η νόσος του Πάρκινσον (Εικόνα 1.1.)

Neurological	
ADHD	Autism
Alzheimer's Disease	Multiple Sclerosis
Anxiety & Depression	Parkinson's Disease
Asperger syndrome	Multiple Sclerosis
Cardiovascular	
Cardiovascular Disease	Hypertension
Angina Pectoris	Atherosclerosis
Multi-System Effects	
Diabetes	Chronic Fatigue Syndrome
Cancer	Metabolic Syndrome
Inflammation	Anxiety
Fibromyalgia	Hyperthyroidism
Lyme Disease	Sleep Apnea
Respiratory	
COPD	Asthma
Gastrointestinal Disorders	
Crohn's Disease	Celiac Disease
GERD	Functional Dyspepsia
Gastric Ulcers	
Joints/Skin	
Gout	Rheumatoid Arthritis
Dermatitis	Carpal Tunnel

Εικόνα 1.1. Πίνακας που καταγράφει ασθένειες και διαταραχές που σχετίζονται με το χρόνιο οξειδωτικό στρες (Alkadi, 2018).

1.3. Αντιοξειδωτικές ουσίες

Ένα αντιοξειδωτικό είναι ένα μόριο αρκετά σταθερό ώστε να προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο σε μια ελεύθερη ρίζα και να την εξουδετερώνει, μειώνοντας έτσι την

ικανότητά της να βλάπτει τον οργανισμό. Τα αντιοξειδωτικά καθυστερούν ή αναστέλλουν τις κυτταρικές βλάβες κυρίως μέσω της ιδιότητάς τους να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και εμποδίζοντας την αντίδρασή τους με βιολογικά μακρομόρια (Beta and Duodu, 2016). Ορισμένα από αυτά τα αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, η ουβινοκινόλη και το ουρικό οξύ, παράγονται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού στο σώμα (Shi et al., 1999).

Παρόλο που υπάρχουν πολλά συστήματα ενζύμων μέσα στο σώμα τα οποία εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, τα βασικά αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη E (α- τοκοφερόλη), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) και το Β-καροτένιο. Ο οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει αυτά τα μικροθρεπτικά συστατικά, οπότε αυτά πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής (Jaeschke and Ramachandran, 2018).

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- βάσει προέλευσης σε εξωγενή ή ενδογενή
- βάσει διαλυτότητας σε υδρόφιλα ή λιπόφιλα και
- βάσει χημικής φύσης σε ενζυμικά ή μη ενζυμικά (Srdić-Rajić and Ristić, 2016).

1.3.1. Μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών

Έχουν προταθεί δύο βασικοί μηχανισμοί δράσης για τα αντιοξειδωτικά. Στον πρώτο μηχανισμό το αντιοξειδωτικό δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην ελεύθερη ρίζα και την εξουδετερώνει. Ο δεύτερος μηχανισμός (δευτεροταγείς αντιοξειδωτικές ουσίες) περιλαμβάνει την απομάκρυνση των ROS/NOS με αναστολή ή επαγωγή του προοξειδωτικών ή αντιοξειδωτικών ενζύμων αντίστοιχα (Krinsky, 1992).

Τα αντιοξειδωτικά δρουν σε τέσσερα επίπεδα άμυνας. Η πρώτη γραμμή άμυνας είναι τα προληπτικά αντιοξειδωτικά, τα οποία καταστέλλουν τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Αν και ο ακριβής μηχανισμός και ο τρόπος σχηματισμού ριζών in vivo δεν έχουν διευκρινισθεί ακόμη, οι διεγειρόμενες από μέταλλα αποσυνθέσεις υδροϋπεροξειδίων και υπεροξειδίου του υδρογόνου πρέπει να είναι μία από τις σημαντικές πηγές. Για να κατασταλούν τέτοιες αντιδράσεις, ορισμένα

αντιοξειδωτικά μετατρέπουν τα υδροϋπεροξειδία και το υπεροξείδιο του υδρογόνου εκ των προτέρων σε αλκοόλες και νερό, αντίστοιχα, χωρίς δημιουργία ελεύθερων ριζών. Η υπεροξειδάση γλουταθειόνης, η s-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση του υδροπεροξειδίου των φωσφολιπιδίων της γλουταθειόνης (PHGPX) και η καταλάση είναι γνωστό ότι αποσυνθέτουν υδροϋπεροξειδία λιπιδίων σε αντίστοιχες αλκοόλες. Το PHGPX είναι μοναδικό στο ότι μπορεί να μειώσει τα υδροϋπεροξειδία των φωσφολιπιδίων που είναι ενσωματωμένα σε βιομεμβράνες. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση μετατρέπουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό.

Η δεύτερη γραμμή άμυνας είναι τα αντιοξειδωτικά που εξουδετερώνουν άμεσα τις δραστικές ρίζες. Διάφορα ενδογενή αντιοξειδωτικά που απομακρύνουν τις ROS είναι (μερικά είναι υδρόφιλα και άλλα είναι λιπόφιλα): Η βιταμίνη C, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η αλβουμίνη και οι θειόλες είναι υδρόφιλα αντιοξειδωτικά, ενώ η βιταμίνη E και η ουβικινόλη είναι λιποφιλικά αντιοξειδωτικά.

Η τρίτη γραμμή άμυνας είναι η επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από ROS. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα, οι πρωτεϊνάσες, οι πρωτεάσες και οι πεπτιδάσες που υπάρχουν στο κυτοσόλιο και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων των θηλαστικών αναγνωρίζουν, αποικοδομούν και απομακρύνουν οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες και αποτρέπουν τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών. Τα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στο συνολικό αμυντικό σύστημα έναντι οξειδωτικής βλάβης.

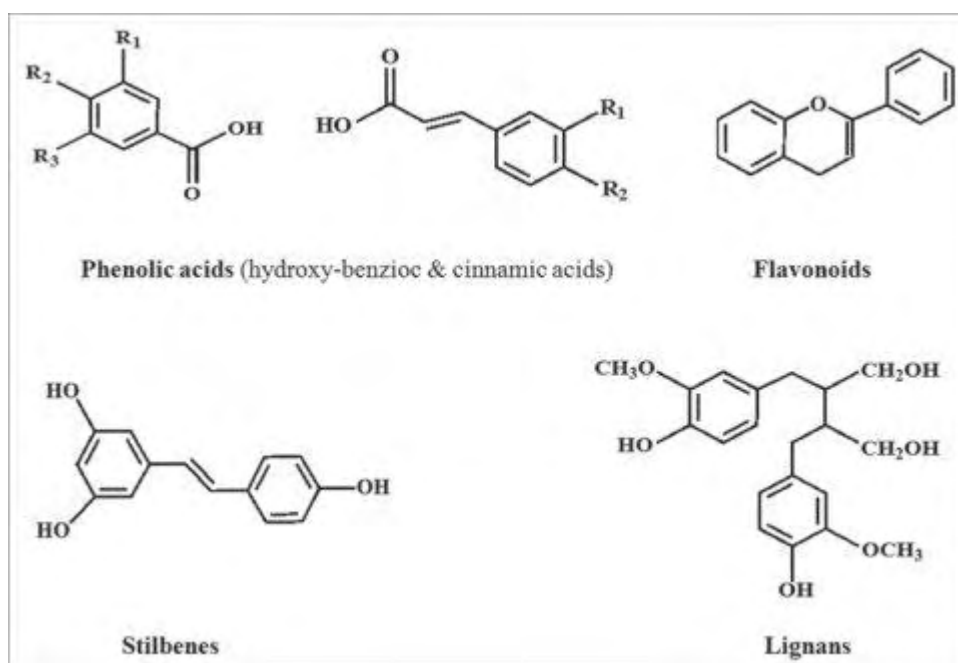
Υπάρχει μια άλλη σημαντική λειτουργία αντιοξειδωτικής άμυνας που ονομάζεται 'προσαρμογή' όπου το σήμα για την παραγωγή και τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών προκαλεί σχηματισμό και μεταφορά του κατάλληλου αντιοξειδωτικού στο σωστό σημείο (Niki, 1993).

1.4. Πολυφαινόλες

Σήμερα, οι πολυφαινόλες αντιπροσωπεύουν έναν από τους πιο γνωστούς δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη και

ποικίλη σειρά μοναδικών βιοδραστικών ιδιοτήτων, γεγονός που τις κάνει να χαίρουν υψηλής εκτίμησης για τις ευεργετικές τους επιδράσεις τόσο στα φυτά όσο και στους ανθρώπους. Οι πολυφαινόλες είναι μια ευρεία κατηγορία ενώσεων που είναι δομικά εξαιρετικά διαφορετικές αλλά απαραίτητες για μια ποικιλία λειτουργιών στα φυτά, υπεύθυνες για τις οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες φυτικών τροφών και χρήσιμες για πολλές πρακτικές εφαρμογές (Belščak-Cvitanović et al., 2018).

Οι πολυφαινόλες δεν περιλαμβάνουν μόνο μία ευρεία ποικιλία μορίων που έχουν δομή πολυφαινόλης (δηλ. μερικές ομάδες υδροξυλίου σε αρωματικούς δακτυλίους) αλλά και μόρια με έναν δακτύλιο φαινόλης, όπως φαινολικά οξέα και φαινολικές αλκοόλες. Αν και οι πολυφαινόλες χαρακτηρίζονται χημικά ως ενώσεις με φαινολικά δομικά χαρακτηριστικά, αυτή η ομάδα φυσικών προϊόντων είναι πολύ διαφορετική και περιέχει αρκετές υποομάδες φαινολικών ενώσεων (Εικόνα 1.2.).



Εικόνα 1.2. Τέσσερις διαφορετικές κατηγοριοποιήσεις φυτικών πολυφαινολών, βάσει του αριθμού των δακτυλίων φαινόλης και των δομικών στοιχείων τους (Πηγή: researchgate.com).

Ο χημικός τύπος της φαινόλης, που είναι το απλούστερο μέλος των φαινολών, είναι C₆H₅OH. Βιογενετικά, οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται από δύο μεταβολικές οδούς: τη μονοπάτι του σικιμικού οξέος, όπου σχηματίζονται κυρίως

φαινυλοπροπανοειδή και του οξικού οξέος στην οποία τα κύρια προϊόντα είναι οι απλές φαινόλες (Sanchez- Moreno, 2002).

Η κατανάλωση λαχανικών και φρούτων, έχει γίνει πιο σημαντική στη διατροφή του ανθρώπου, λόγω της προστασίας που παρέχεται από την υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις (Blomhoff et al., 2006). Επίσης, έχει βρεθεί μια άμεση σχέση μεταξύ του περιεχομένου των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτών (Ferreira et al., 2007; Barreira et al., 2008).

1.4.1. Αντιοξειδωτική ικανότητα των πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες έχουν βρεθεί ότι είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά που μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες με τη προσφορά ενός ατόμου ηλεκτρονίου ή ενός υδρογόνου. Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των πολυφαινολών μπορούν να περιλαμβάνουν άμεση δέσμευση ριζών, χηλική δράση με την οποία απομακρύνονται ιόντα μετάλλων που εμπλέκονται στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, αναστολή ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών και αναγέννηση αντιοξειδωτικών συνδεδεμένων με μεμβράνες όπως α-τοκοφερόλη (Nijveldt et al., 2001; Rice-Evans et al., 1996; Liu and Guo, 2005).

Οι πολυφαινόλες υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα σε μικρές συγκεντρώσεις και συχνά η φυσική τους δομή αλλάζει λόγω του μεταβολισμού που συμβαίνει στη μικροχλωρίδα που υπάρχει στο ανθρώπινο έντερο ή μεταβολίζονται στο ήπαρ. Παρά το γεγονός αυτό, οι ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία έχουν αναφερθεί εδώ και πολλές δεκαετίες από πολλούς συγγραφείς, οπότε η πλειοψηφία των ερευνών κατευθύνεται στον καθορισμό των μηχανισμών δράσης και πιθανών εφαρμογών των πολυφαινολών (Belščak-Cvitanović et al., 2018).

Οι πολυφαινόλες μπορούν να αντιδράσουν στη κυτταροπλασματική μεμβράνη με μη πολικές ενώσεις που υπάρχουν στο υδρόφοβο τμήμα της μεμβράνης (εσωτερική στιβάδα) και αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να επηρεάσουν τον ρυθμό οξειδωσης πρωτεϊνών και λιπιδίων. Ορισμένα φλαβονοειδή στον υδρόφοβο πυρήνα της

μεμβράνης μπορούν να εμποδίσουν την πρόσβαση των οξειδωτικών και να προστατεύσουν τη δομή και τη λειτουργία της μεμβράνης (Hussain et al., 2016).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα φλαβονοειδή μπορούν να οξειδωθούν άμεσα από ελεύθερες ρίζες λόγω της υψηλής αντιδραστικότητας της ομάδας υδροξυλίου των φλαβονοειδών, με αποτέλεσμα τον πιο σταθερό και λιγότερο δραστικό σχηματισμό ριζών. Ορισμένα φλαβονοειδή μπορούν να εξουδετερώσουν άμεσα τα υπεροξείδια. Λόγω αυτών των αντιδράσεων για παράδειγμα, τα φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν την οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), εμποδίζοντας την εμφάνιση αρθροσκλήρωσης (Belščak-Cvitanović et al., 2018).

Τα διαφορετικά φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση σε διαφορετικά μοντέλα μεμβράνης όπως μικροσώματα, λιποσώματα, LDL κ.λπ. (Gordon and Roedig-Penman, 1998; van Acker et al., 2000; Ozgova et al., 2003). Επιπρόσθετα, τα φλαβονοειδή μπορούν να έρθουν σε αλληλεπίδραση με λιπίδια ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) και πρωτεΐνες που εμφανίζουν αντιοξειδωτικές και αντιαιμολυτικές επιδράσεις (Chaudhuri et al., 2007). Η υπεροξείδωση λιπιδίων που επάγεται από Cu^{2+} προκαλεί μετατόπιση φωσφατιδυλοσερίνης και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της μεμβράνης και φωσφατιδυλοχολίνης από το εξωτερικό στο εσωτερικό της μεμβράνης (Chattopadhyay et al., 2000), με αποτέλεσμα την αλλοίωση της ρευστότητας της μεμβράνης. Η ενσωμάτωση του φλαβονοειδών σε μεμβράνη RBC αναστέλλει την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την αλλοίωση της κατανομής των φωσφολιπιδίων (Chaudhuri et al., 2007). Επίσης, η ενσωμάτωση φλαβονοειδών σε μεμβράνες RBC ενισχύει τη σταθερότητα των ακέραιων ερυθροκυττάρων έναντι της λύσης. Η αποτελεσματικότητα της αντιαιμολυτικής δράσης είναι καλύτερη για την φισετίνη και τη χρυσίνη, ενώ η κερκετίνη έχει χαμηλότερη αντιαιμολυτική ιδιότητα (Chaudhuri et al., 2007).

1.5. Καστανιά (*Castanea sativa*)

Το επιστημονικό όνομα του δένδρου είναι *Castanea sativa*. Ανήκει στην Τάξη Fagales, την Οικογένεια Fagaceae, το γένος *Castanea* και το είδος *Castanea sativa* (Εικόνα 1.3.).



Εικόνα 1.3. Δέντρο Καστανιάς (*Castanea sativa*).
(Πηγή: caraghnurseries.ie)

Τα γνωστά είδη της καστανιάς είναι:

A. Ευρωπαϊκή Καστανιά (*Castanea sativa*, Mill) ή *Castanea vulgaris*

B. Ιαπωνική καστανιά (*Castanea crenata*) (Sied.et Zucr)

Γ. Κινέζικη καστανιά (*Castanea mollissima*)

Η καλλιέργεια της καστανιάς μπορεί να αποτελέσει πόλο ανάπτυξης της οικονομίας και κυρίως σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές με χαμηλό αγροτικό εισόδημα. Οι λόγοι είναι πολλοί. Έτσι, η καστανιά αξιοποιεί φτωχά και ορεινά εδάφη και δίνει εισόδημα σε περιοχές όπου ουσιαστικά δεν υπάρχει δυνατότητα για εναλλακτικές καλλιέργειες. Η καστανιά παράγει κάθε χρόνο πολύτιμο ξύλο, είναι ταχιαυξές δένδρο και συμβάλλει στη βελτίωση του τοπίου υπό μορφή δάσους. Η καστανοκαλλιέργεια έχει υποβαθμιστεί τα τελευταία χρόνια και η παραγωγή

κάστανων μπορεί να αυξηθεί στη χώρα μας και να προσφέρει επί πλέον εισόδημα στον παραγωγό. Η μέση κατανάλωση καστώνων κατ' άτομο σε διάφορες χώρες δεν υπερβαίνει τα 1,8 kg (Θεριός και Δημασή- Θεριού, 2013).

1.5.1. Εκχυλίσματα καστανιάς και αντιοξειδωτική δράση

Οι αναφορές σε παραπροϊόντα της καστανιάς, όπως τα φύλλα και το κέλυφος του καρπού, αποκάλυψαν ότι μπορούν να θεωρηθούν καλή πηγή φαινολικών ενώσεων με έντονη βιολογική δραστηριότητα και κυρίως αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Braga et al., 2015). Επίσης, το εκχύλισμα φύλλων από *C. sativa* έχει αποδειχθεί στο παρελθόν ότι επιδεικνύει *in vitro* αντιοξειδωτική δράση έναντι αρκετών δραστικών ριζών που ανιχνεύονται στο δέρμα μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), συμπεριλαμβανομένου του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) (Almeida et al., 2008; 2018), καθώς και ότι εμφανίζει προστατευτική δράση, εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση, έναντι της προκαλούμενης από UV ακτινοβολίας καταστροφής του κυτταρικού DNA, στα κύτταρα HaCaT. Αυτό το αποτέλεσμα βρέθηκε ότι σχετίζεται με μια άμεση αντιοξειδωτική δράση και όχι με την ενεργοποίηση της ενδογενούς αντιοξειδωτικής απόκρισης που συντονίζεται από το NRF2 γονίδιο (Almeida et al., 2015). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν κι από μια άλλη πειραματική ομάδα (Cerulli et al., 2017).

Η παρουσία φυσικών αντιοξειδωτικών στα κάστανα, όπως το γαλλικό και το ελλαγικό οξύ (Barreira et al., 2008) έχει συσχετιστεί με διάφορες θετικές επιδράσεις στην υγεία (Hooper et al., 2008; Dinis et al., 2012). Εντούτοις, πρέπει να τονιστεί ότι τα επίπεδα των επιμέρους φαινολικών ενώσεων, όπως και άλλων βιοχημικών ενώσεων, συνδέονται στενά με τις κλιματικές συνθήκες της ανάπτυξης των δέντρων (Ceksteryte et al., 2006; Dinis et al., 2011; Kenjeric et al., 2007).

Επιπλέον, φαινολικές ενώσεις από εκχυλίσματα της *Castanea sativa* Mill. έδειξαν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς και ικανότητα να προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες από οξειδωτική βλάβη εισερχόμενες στην λιπιδική διπλοστοιβάδα και εμποδίζοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αυτά τα χαρακτηριστικά δείχνουν ότι επιλεγμένες φαινολικές ενώσεις εκχυλισμάτων

κάστανου θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εύκολα προσβάσιμα φυσικά αντιοξειδωτικά και για τη θεραπεία παθοφυσιολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Zivkovic et al., 2009).

1.6. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση και η προσπάθεια εύρεσης των ιδεατών συνθηκών για να επιτευχθεί μέγιστη περιεκτικότητα πολυφαινόλων και μέγιστη αντιοξειδωτική δράση από εκχυλίσματα φύλλων και καρπών Ευρωπαϊκής Καστανιάς (*Castanea sativa*) με τη χρήση μικροκυμάτων από τη περιοχή της Μελιβοίας του Ν. Λάρισας.

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Δείγματα και Μέθοδοι

Τα πειραματικά δείγματα αποτελούνται από φύλλα και όπως και από μείγμα που αποτελείται από μικρά σε μέγεθος κάστανα (πάνω από 150 κάστανα/kg) σε ποσοστό 50% καθώς και ποσοστό 50 % μη επαρκώς σχηματοποιημένα κάστανα). Πιο αναλυτικά, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης ήταν 20 δείγματα φύλλων και 17 δείγματα από το ανωτέρω αναφερόμενο μείγμα κάστανων. Με τη μέθοδο της εκχύλισης με μικροκύματα λήφθηκαν εκχυλίσματα από όλα τα δείγματα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 2 μετρήσεις: 1) της αναστολής (εξουδετέρωσης) της ρίζας DPPH από κάθε εκχύλισμα, προκειμένου να αξιολογηθεί το αντιοξειδωτικό δυναμικό καθενός εκχυλίσματος και 2) του προσδιορισμού των συνολικών πολυφαινόλων του κάθε εκχυλίσματος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση με την μεθοδολογία διακριτών επιφανειών (Response surface methodology ή Box-Behnken).

2.2. Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Η εκχύλιση με υποβοήθηση μικροκυμάτων είναι μια τεχνική που συνδυάζει την ενέργεια μικροκυμάτων και την παραδοσιακή εκχύλιση με διαλύτη για τη θέρμανση των πολικών διαλυτών σε επαφή με στερεά δείγματα και για τη διαίρεση των ενδιαφερόντων ενώσεων μεταξύ του δείγματος και του διαλύτη, μειώνοντας τόσο τον χρόνο εκχύλισης όσο και την κατανάλωση διαλύτη (Gagaoua, 2018).

2.3. DPPH

Η μέθοδος εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) προσφέρει μια πρώτη προσέγγιση για την αξιολόγηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού μίας ένωσης, ενός εκχυλίσματος ή άλλων βιολογικών πηγών. Πρόκειται

για την απλούστερη μέθοδο, όπου η υπό εξέταση ένωση ή το εκχύλισμα αναμιγνύεται με διάλυμα DPPH και η απορρόφηση καταγράφεται μετά από μια καθορισμένη περίοδο. Ωστόσο, με την πρόοδο και την πολυπλοκότητα στις τεχνικές των οργάνων, η μέθοδος έχει υποστεί διάφορες τροποποιήσεις για να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις, παρόλο που η βασική προσέγγιση παραμένει ίδια (Kedare and Singh, 2011).

Αρχικά προετοιμάστηκε το διάλυμα DPPH• την ημέρα του πειράματος και καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο διότι είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 50 μM ρίζας DPPH•). Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν τα διαλύματα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 1000 μl. Πρώτα προστέθηκαν τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και το H₂O και τέλος το διάλυμα της ρίζας, με σταθερό γρήγορο ρυθμό.

2.4. Προσδιορισμός ολικών πολυφαινολών με τη μέθοδο Folin - Ciocalteu

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FCR) ή αντιδραστήριο φαινόλης Folin ή αντιδραστήριο Folin-Denis, που ονομάζεται επίσης μέθοδος ισοδυναμίας γαλακτικού οξέος (GAE), είναι ένα μείγμα φωσφορομολυβδαινικού και φωσφονικού άλατος που χρησιμοποιείται για τη χρωματομετρική *in vitro* δοκιμασία φαινολικών και πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών (Singleton et al., 1999).

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ($P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$, $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου- βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃, αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης. Τα μίγματα της αντίδρασης παρασκευάστηκαν σε

eppendorf tubes σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Για κάθε κατάσταση είχαμε 3 επαναλήψεις:

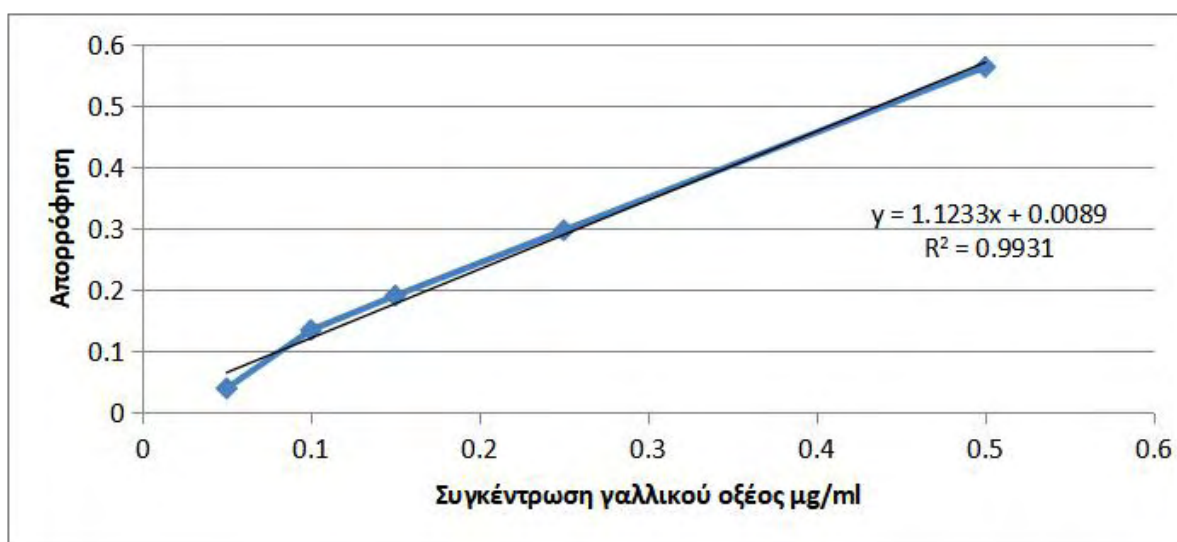
Πίνακας Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Δείγμα	Negative Control	Τυφλό
dH ₂ O	1ml	1,1ml	1,02ml
Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	100μl	-	100μl
C1	20μl	20μl	-
C2	20μl	20μl	-

Ακολούθως, τα δείγματα επώαστηκαν για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε μίγμα προστέθηκαν 280 μl Na₂CO₃ (25% w/v) και 600μl απιονισμένο νερό και ακολούθησε ανάδευση με vortex. Μετά από 1 ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 765nm (Priftis et al., 2015).

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραίωση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0,05, 0,1, 0,15, 0,25 ,0,5, mg/ml γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 1,1233x + 0,0089$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman $r = 0,9931$ Το συνολικό

πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



.Το διάγραμμα απεικονίζει την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

2.5. Στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο Box-Behnken με τη χρήση μικροκυμάτων

Στην στατιστική, η Box-Behnken ανάλυση είναι ένας πειραματικός σχεδιασμός για την μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης, που επινοήθηκε από τον George E.P. Box και τον Donald Behnken το 1960, για την επίτευξη των ακόλουθων στόχων:

Κάθε παράγοντας, ή ανεξάρτητη μεταβλητή, τοποθετείται σε μία από τρεις εξισωμένες τιμές, συνήθως κωδικοποιημένες ως -1, 0, +1. (Απαιτούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα για τον ακόλουθο στόχο.

Τα σχέδια Box-Behnken χρησιμοποιούνται για την παραγωγή επιφανειών απόκρισης υψηλότερης τάξης χρησιμοποιώντας λιγότερες απαιτούμενες διαδρομές από μια κανονική παραγοντική τεχνική. Για το λόγο αυτό η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως σε βιολογικά πειράματα (Rao and Kumar, 2012).

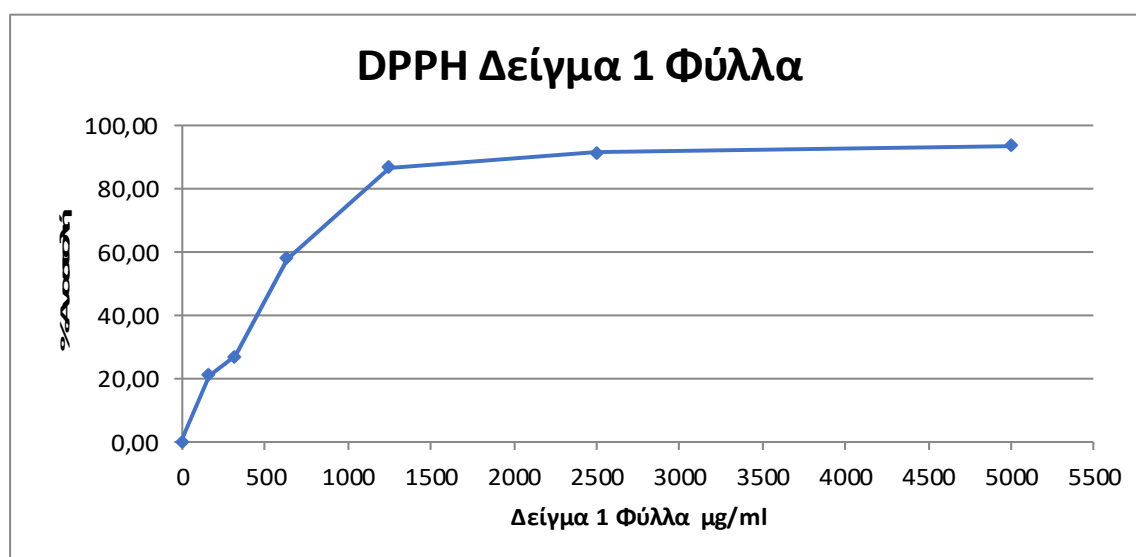
Στην περίπτωση τριών παραγόντων, τα σημεία βρίσκονται στη μέση των άκρων του πειραματικού τομέα. Αυτά τα σχέδια απαιτούν τρία επίπεδα ανά παράγοντα. Ο σχεδιασμός Box-Behnken για τρεις παράγοντες δεν συμμορφώνεται με τα κριτήρια ισομετρικής διακύμανσης ανά περιστροφή. Ωστόσο, τα σχέδια πάνω από τρεις παράγοντες μπορούν να ικανοποιήσουν τα κριτήρια ισο-παραλλαγής εάν προστεθούν σημεία στο κέντρο. Αυτά τα σχέδια μπορούν επίσης να σέβονται τα κριτήρια ορθογωνικότητας. Αν οι παράγοντες που μελετώνται διατηρούνται σε σταθερό επίπεδο, μπορεί να διεξαχθεί μια διαδοχική μελέτη (Ait- Amir et al., 2015).

Μια επιφάνεια απόκρισης είναι μια γεωμετρική αναπαράσταση μίας μεταβλητής απόκρισης σχεδιασμένης ως συνάρτηση των ανεξάρτητων μεταβλητών. Αυτό το πείραμα παρέχει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με μια μεταβλητή εξαρτώμενης ή απόκρισης από ένα σχέδιο δύο παραγόντων παράγοντα ή κλασματική-παράγοντα. Ένας συντελεστής τριών επιπέδων έχει ένα κεντρικό σημείο που συμπεριλαμβάνεται για κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή μαζί με τα υψηλά και τα χαμηλά σημεία, απαιτώντας τρία πειράματα για κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή. Αυτό ονομάζεται συντελεστής τριών επιπέδων λόγω του τρίτου επιπέδου παράγοντα. Η ένταξη του τρίτου παράγοντα αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των πειραμάτων (Wagner et al., 2014).

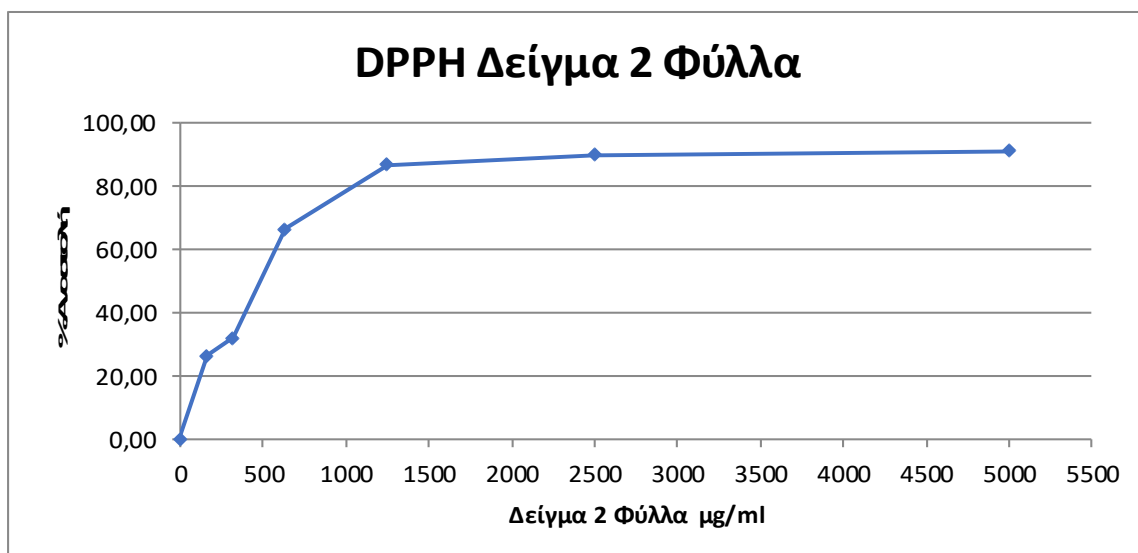
Κεφάλαιο 3^ο: Αποτελέσματα

3.1. DPPH

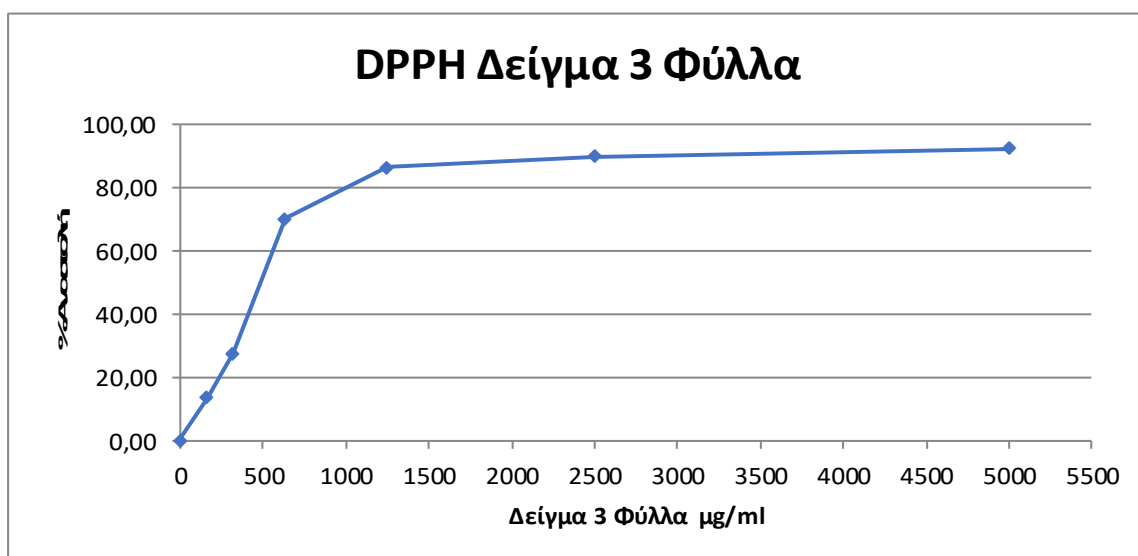
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η επί τοις εκατό (%) αναστολή της ρίζας DPPH από κάθε εκχύλισμα δείγματος, ξεχωριστά. Πρώτα παρατίθενται τα σχετικά διαγράμματα για τα 20 δείγματα φύλλων (Διαγράμματα 1-20).



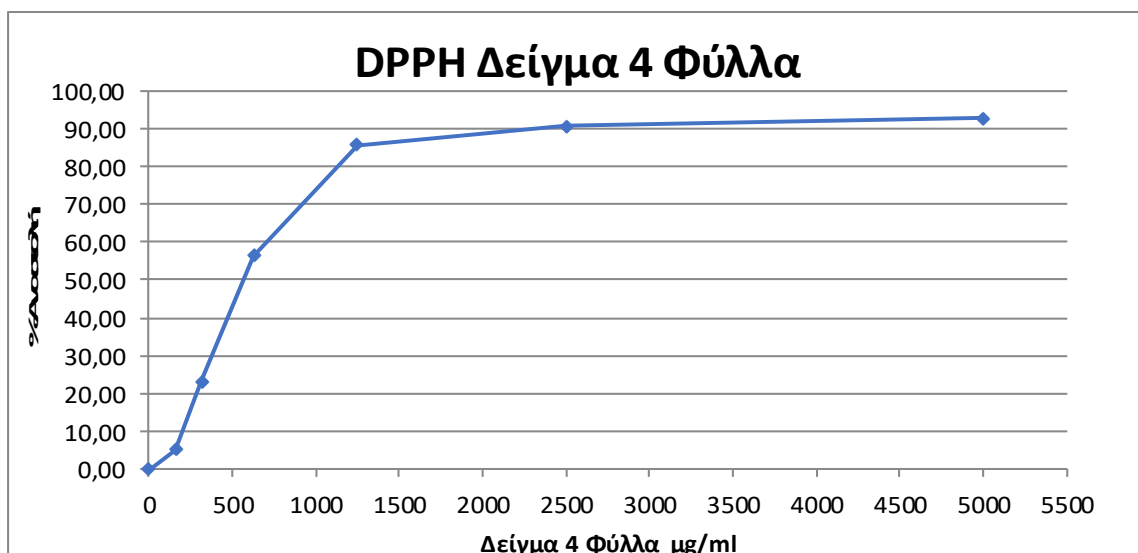
Διάγραμμα 1. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 1 Φύλλα.



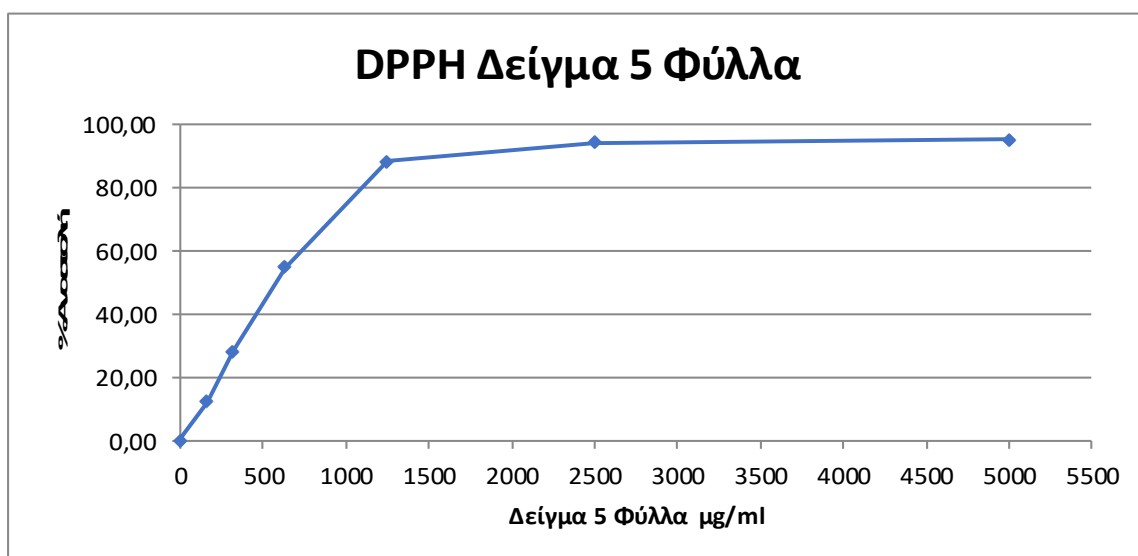
Διάγραμμα 2. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 2 Φύλλα.



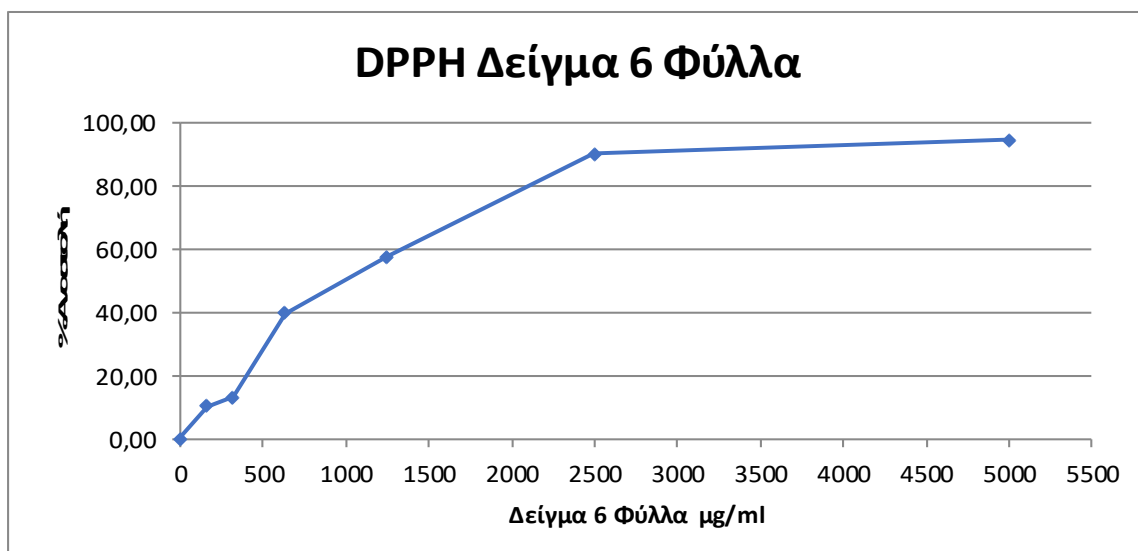
Διάγραμμα 3. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 3 Φύλλα.



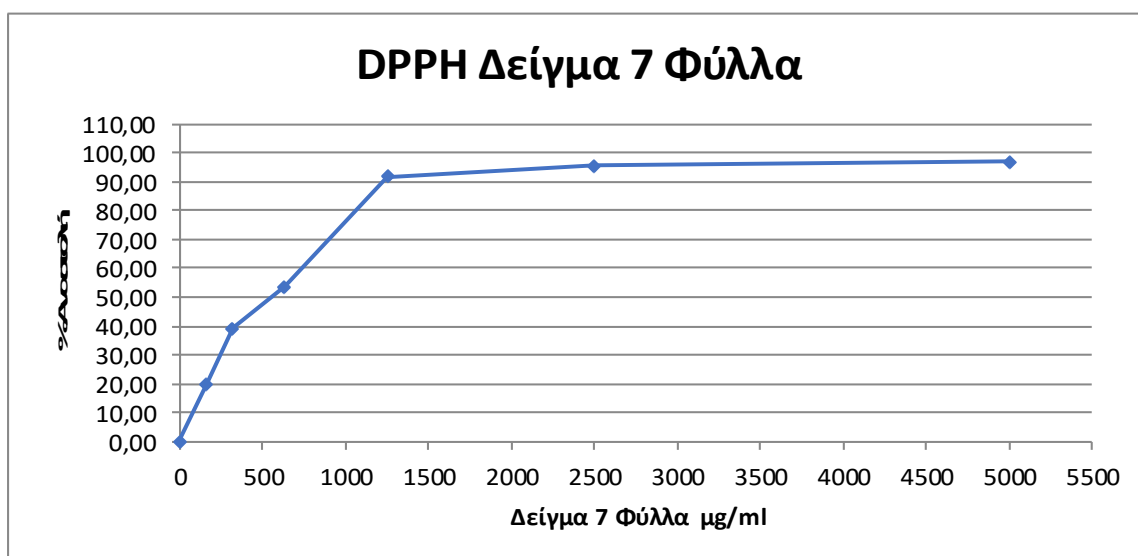
Διάγραμμα 4. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 4 Φύλλα.



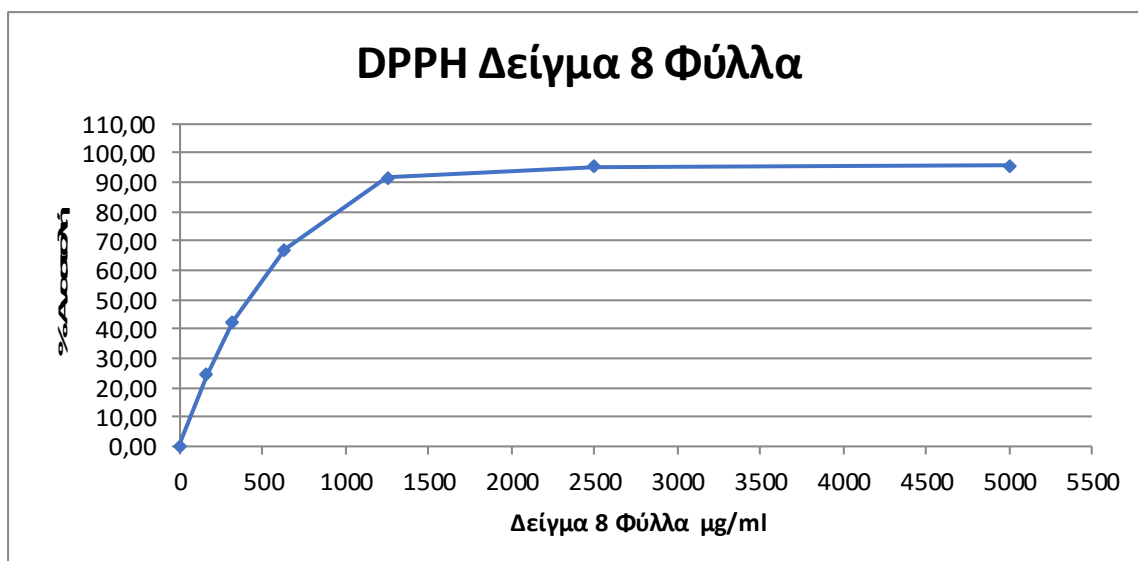
Διάγραμμα 5. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 5 Φύλλα.



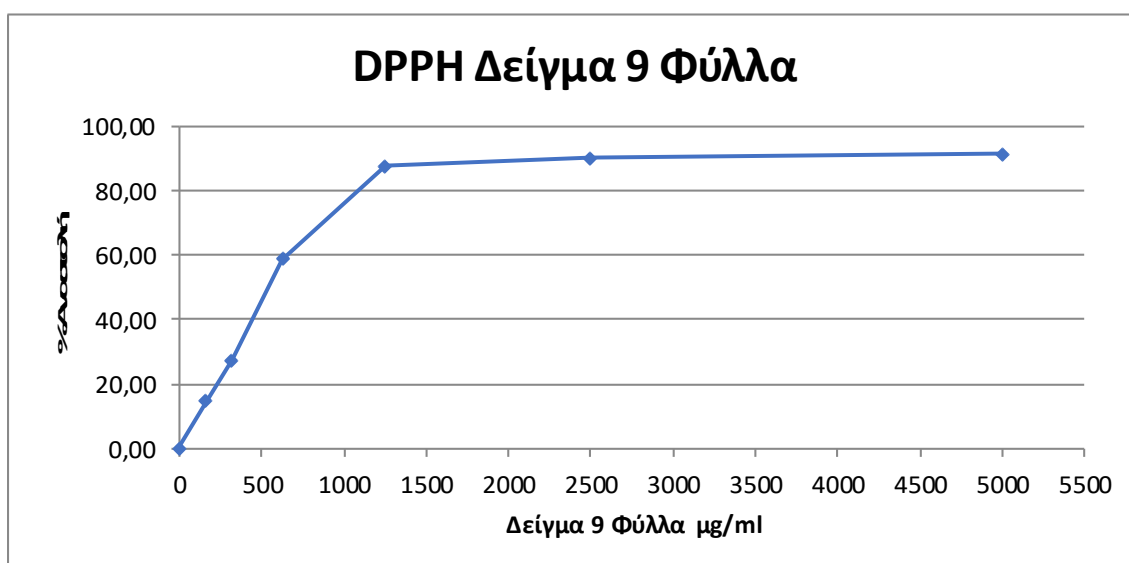
Διάγραμμα 6. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 6 Φύλλα.



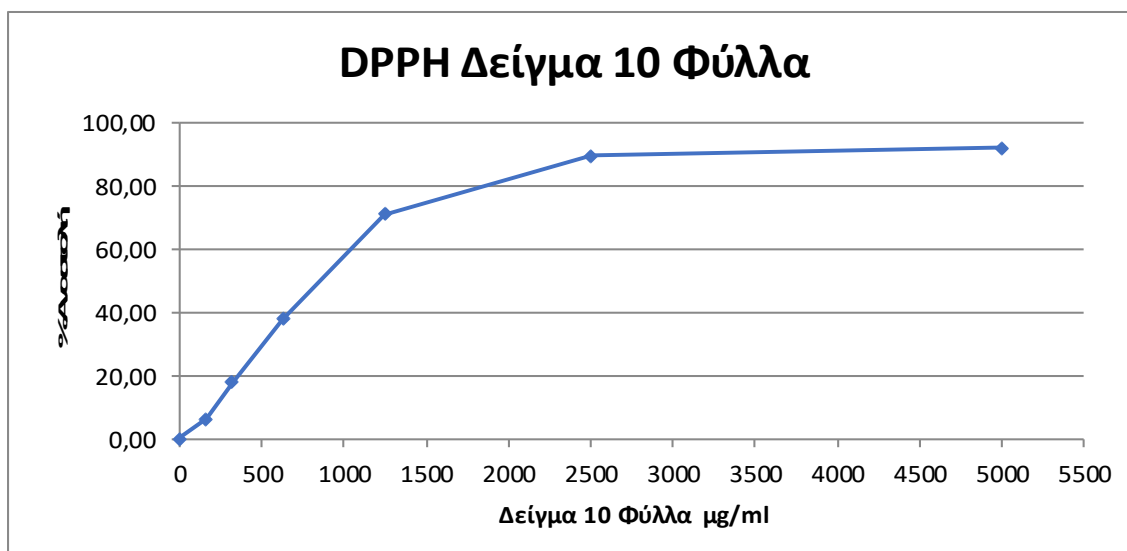
Διάγραμμα 7. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 7 Φύλλα.



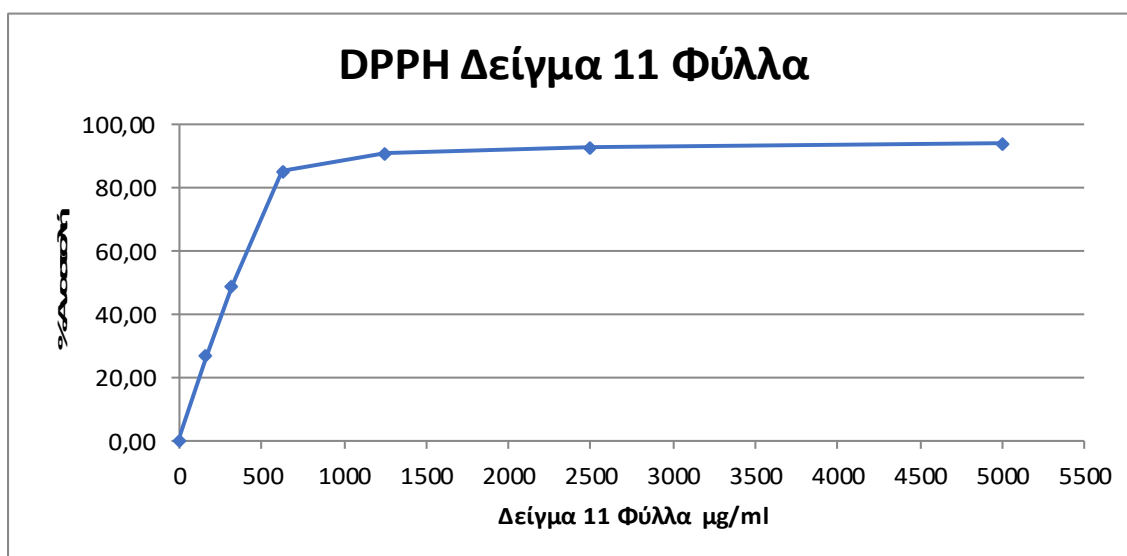
Διάγραμμα 8. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 8 Φύλλα.



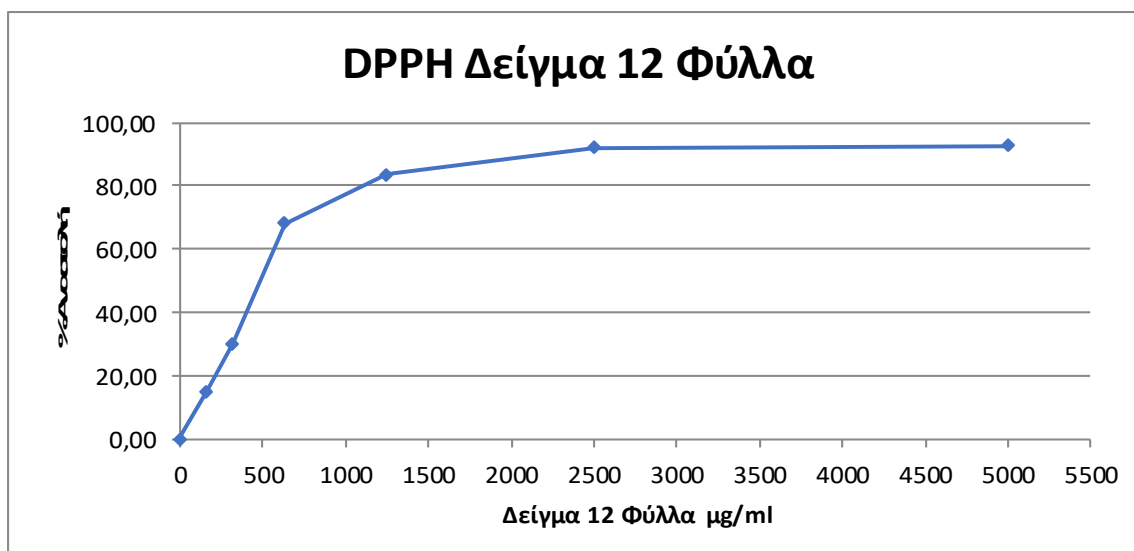
Διάγραμμα 9. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 9 Φύλλα.



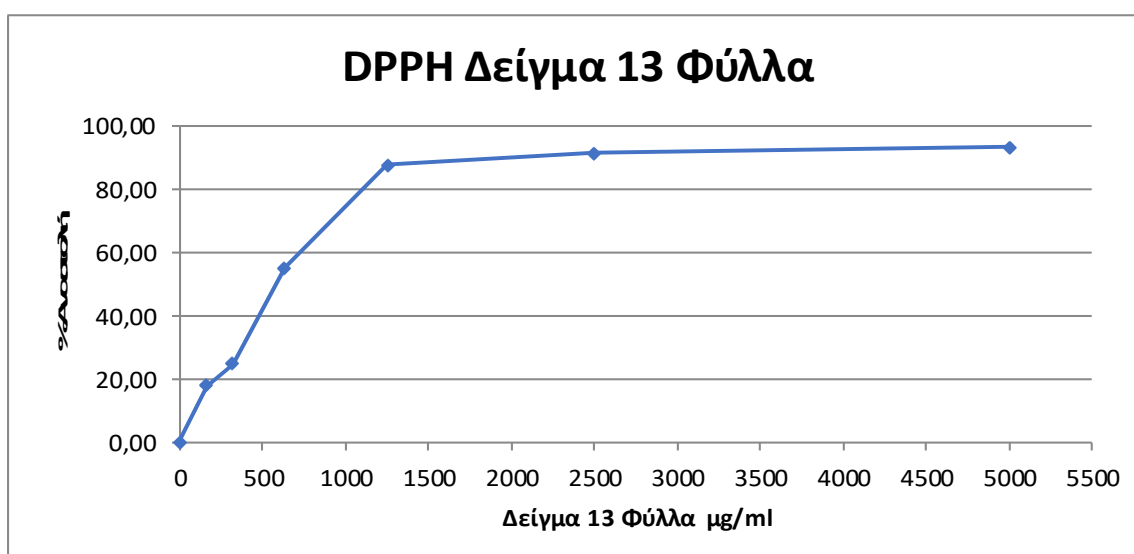
Διάγραμμα 10. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 10 Φύλλα.



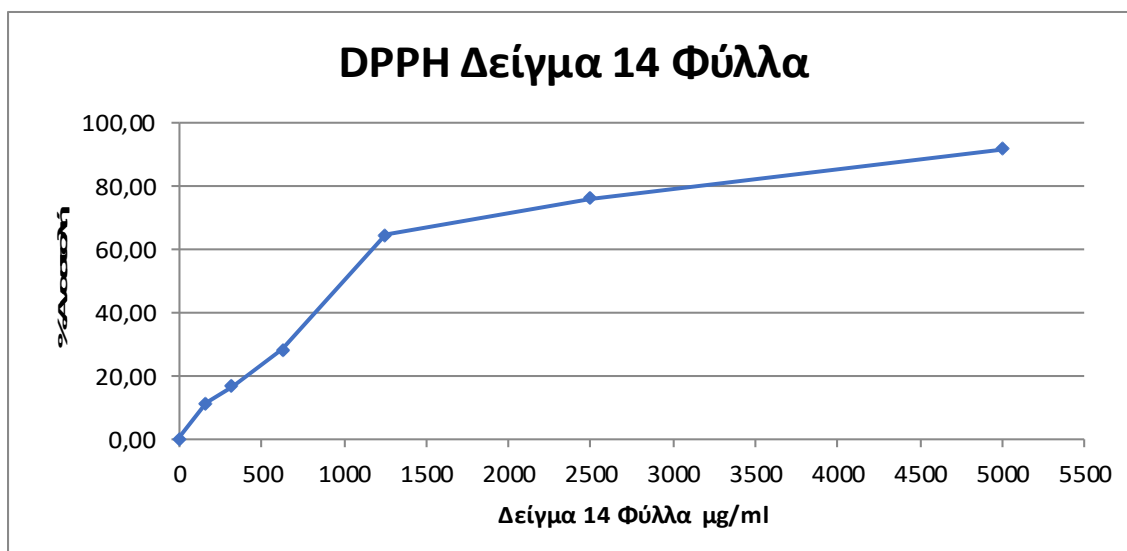
Διάγραμμα 11. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 11 Φύλλα



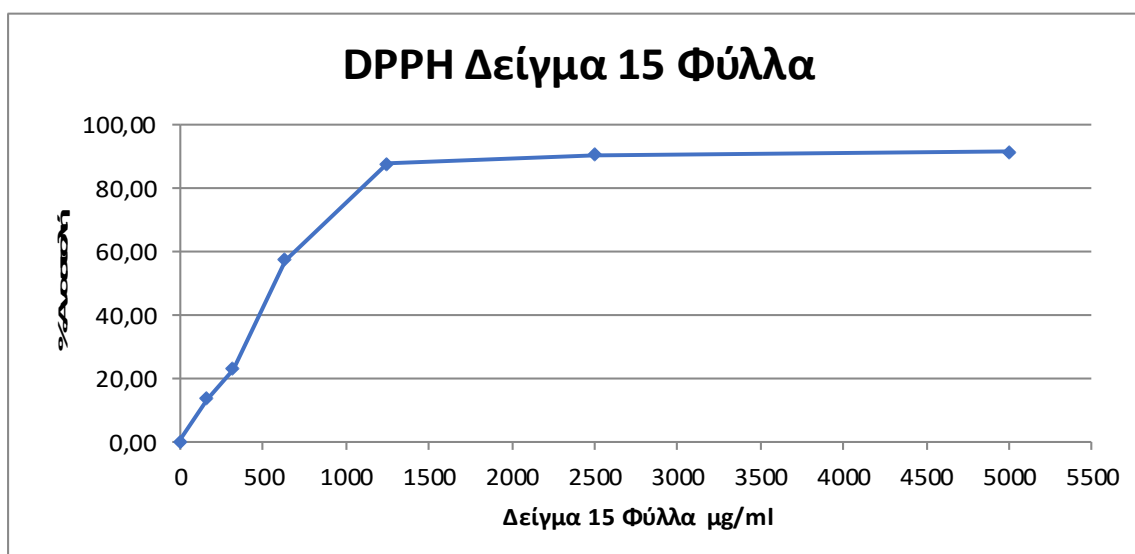
Διάγραμμα 12. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 12 Φύλλα.



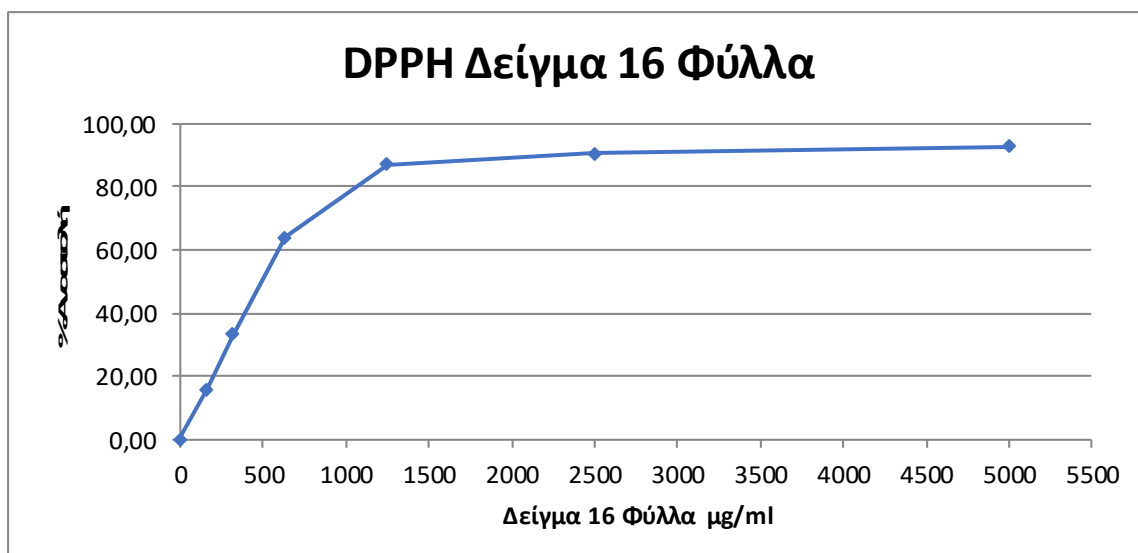
Διάγραμμα 13. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 13 Φύλλα.



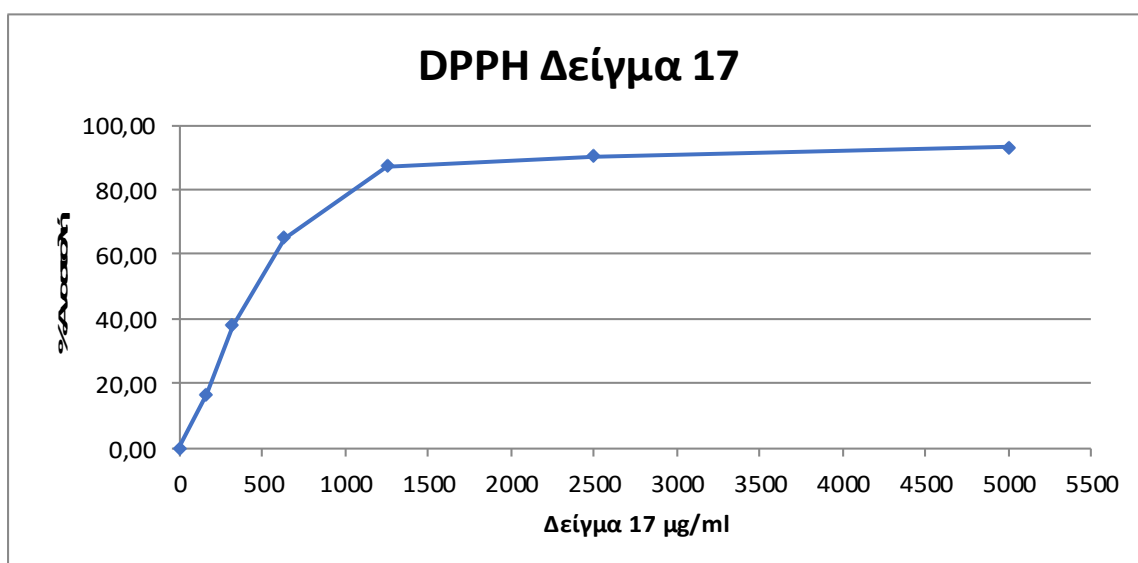
Διάγραμμα 14. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 14 Φύλλα.



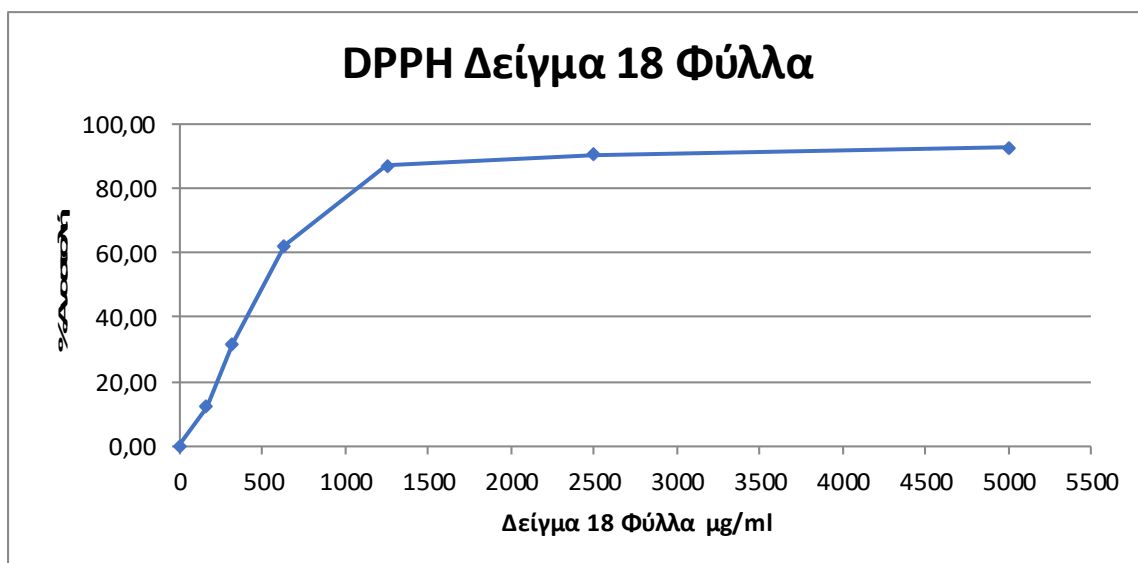
Διάγραμμα 15. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 15 Φύλλα.



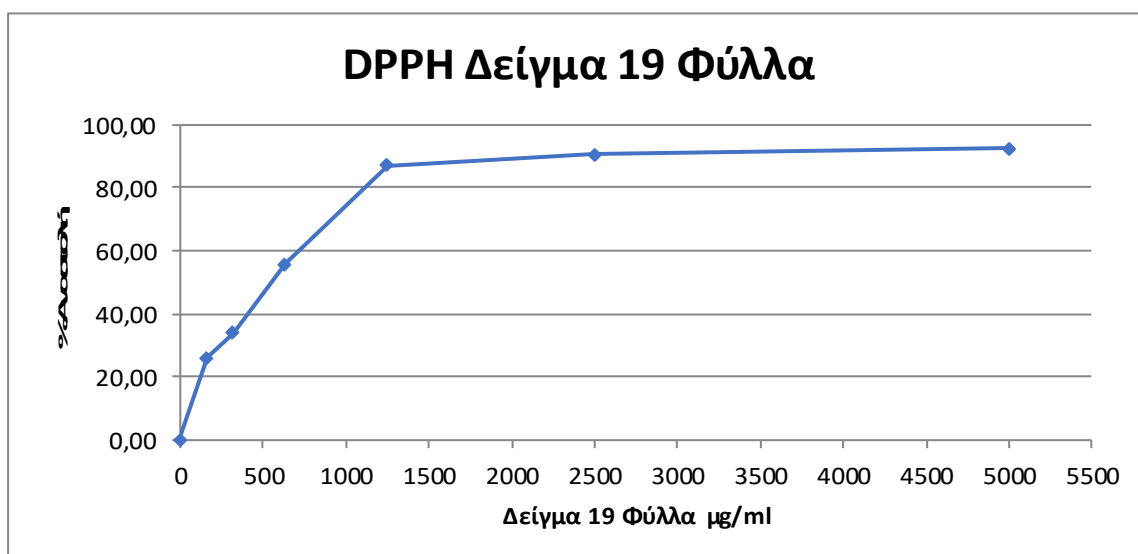
Διάγραμμα 16. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 16 Φύλλα



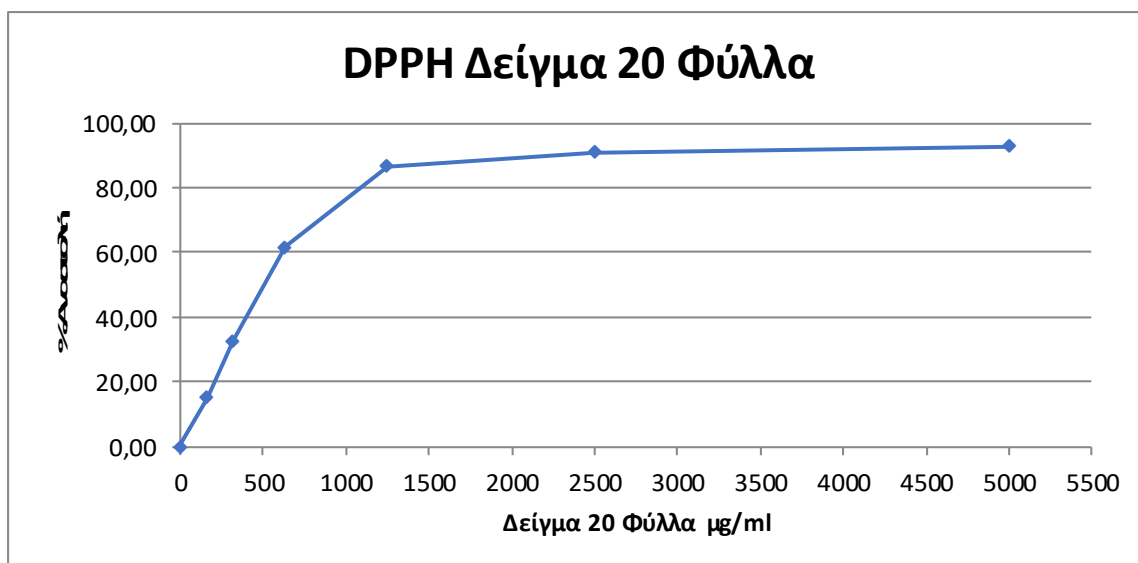
Διάγραμμα 17. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 17 Φύλλα.



Διάγραμμα 18. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 18 Φύλλα.

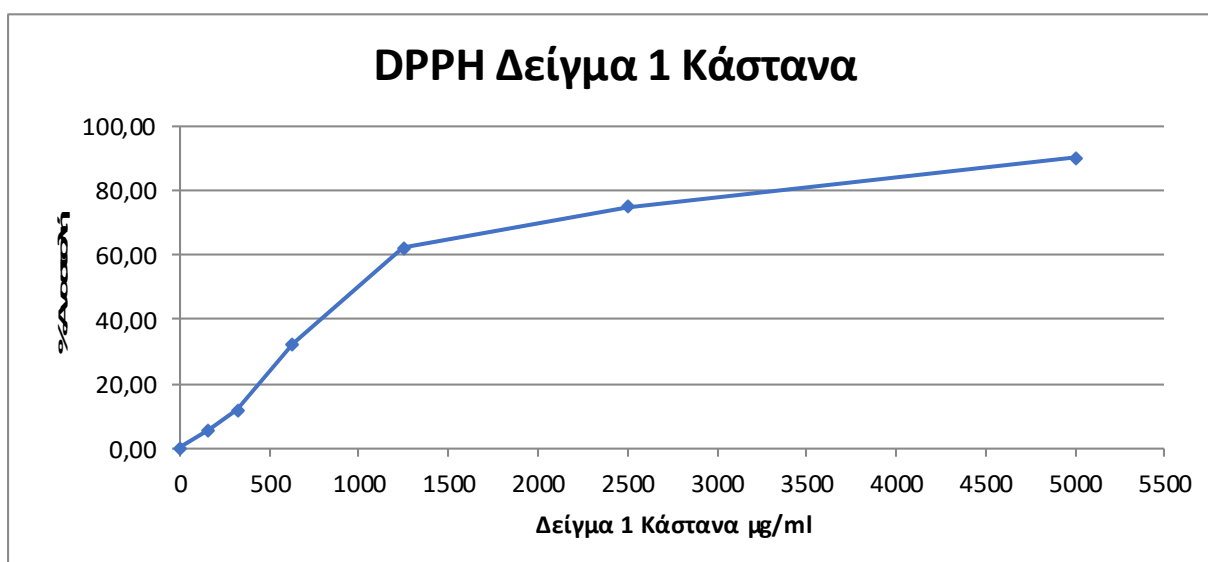


Διάγραμμα 19. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 19 Φύλλα.

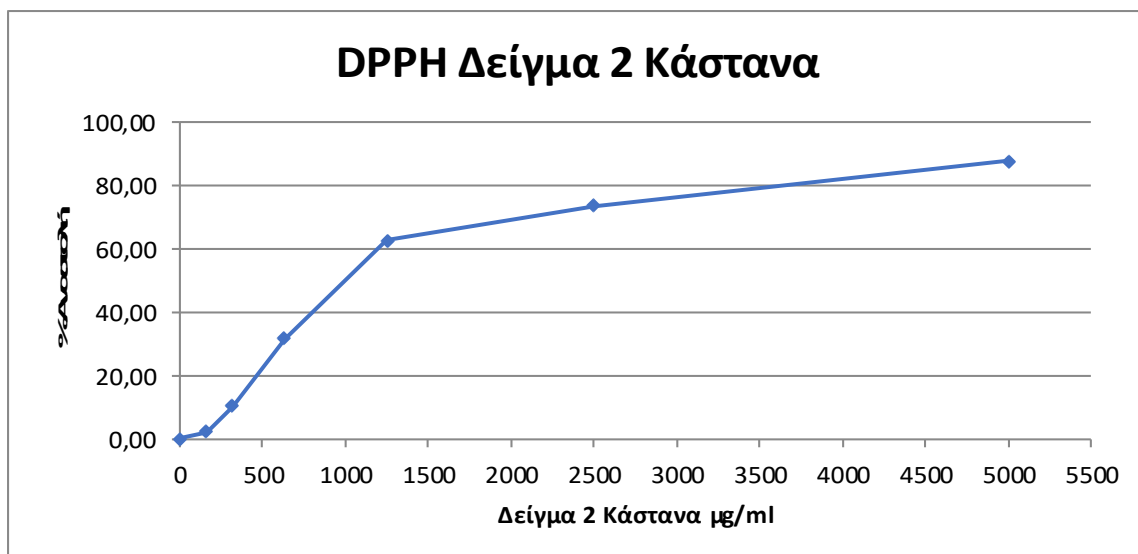


Διάγραμμα 20. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 20 Φύλλα.

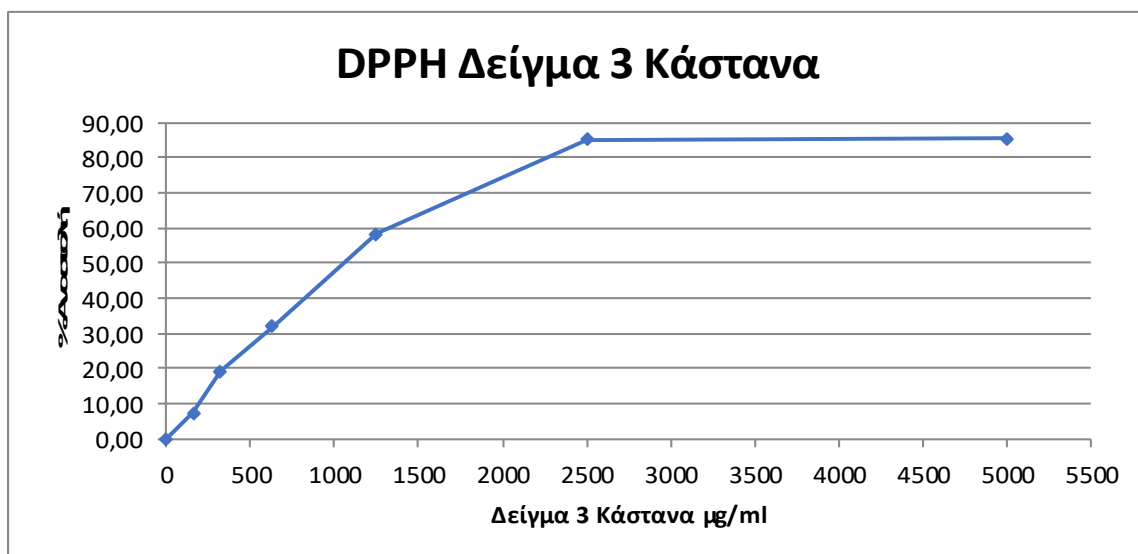
Παρακάτω παρατίθενται τα σχετικά διαγράμματα για την επί τοις εκατό (%) αναστολή της ρίζας DPPH από τα εκχυλίσματα των 17 δειγμάτων κάστανων (Διαγράμματα 21-37).



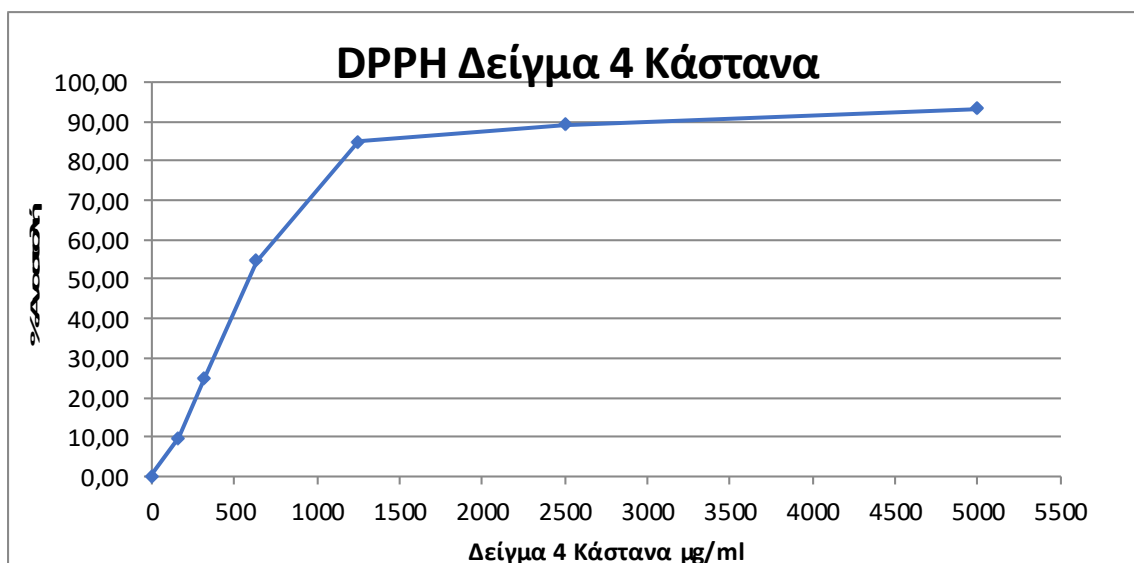
Διάγραμμα 21. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 1 Κάστανα.



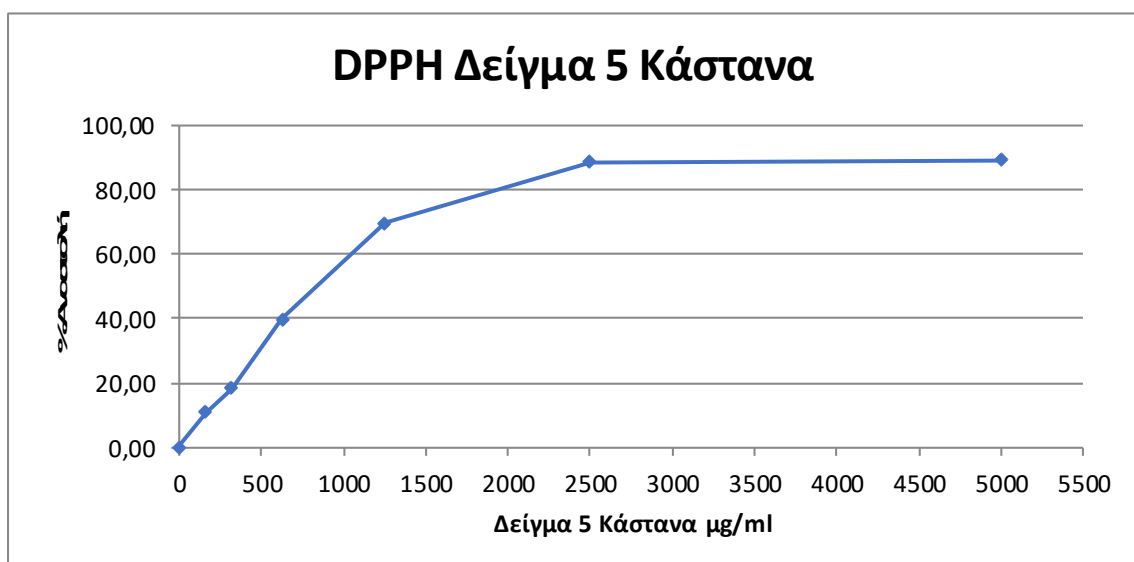
Διάγραμμα 22. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 2 Κάστανα.



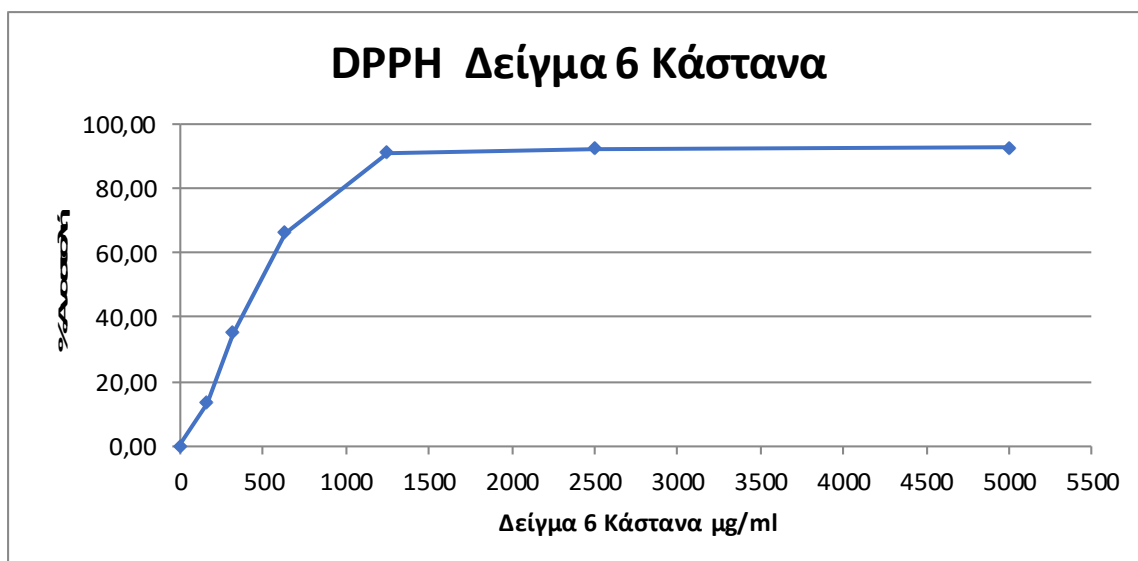
Διάγραμμα 23. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 3 Κάστανα.



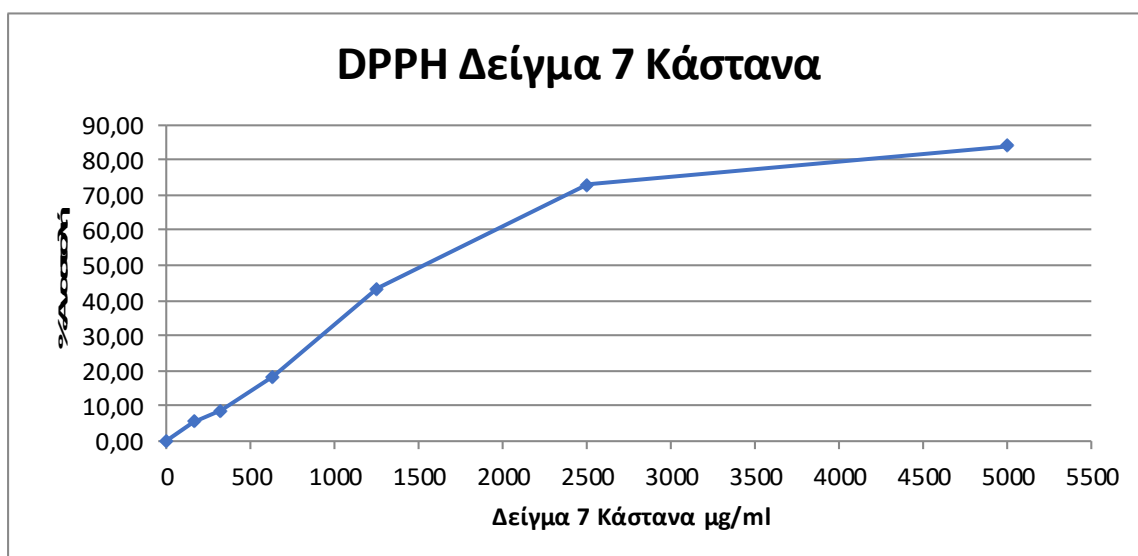
Διάγραμμα 24. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 4 Κάστανα.



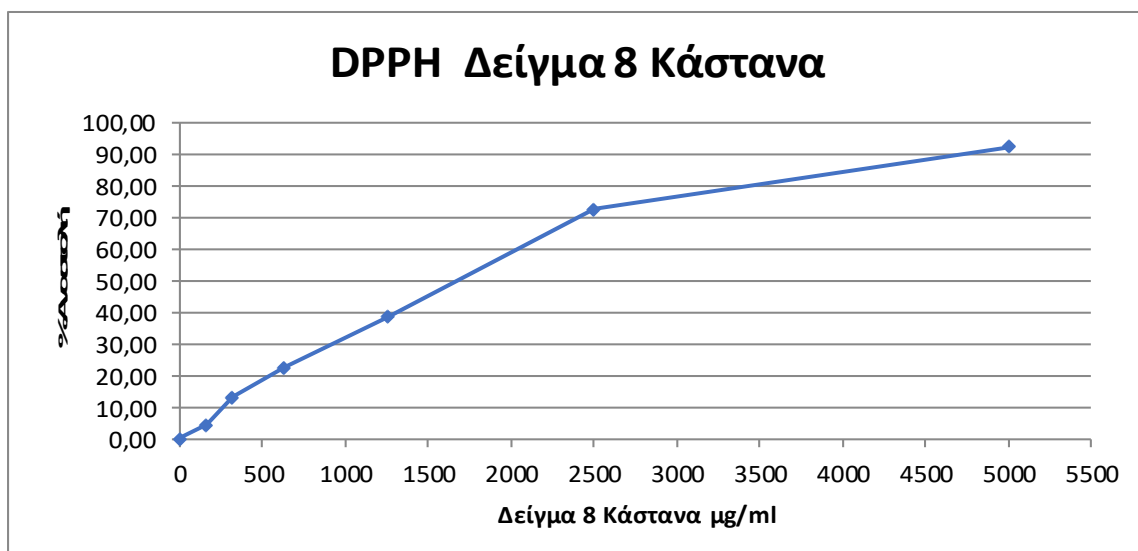
Διάγραμμα 25. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 5 Κάστανα.



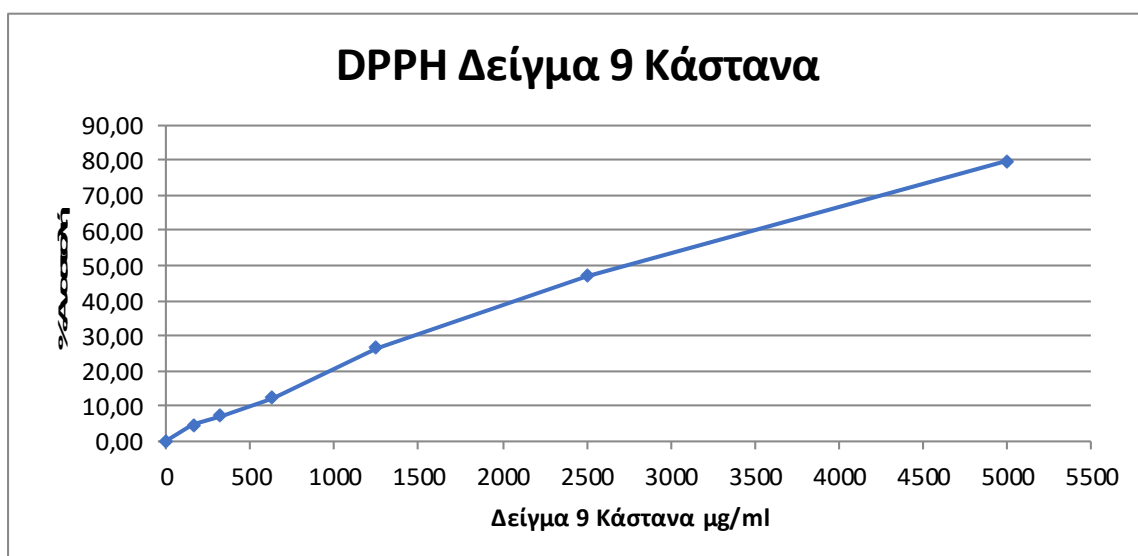
Διάγραμμα 26. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 6 Κάστανα.



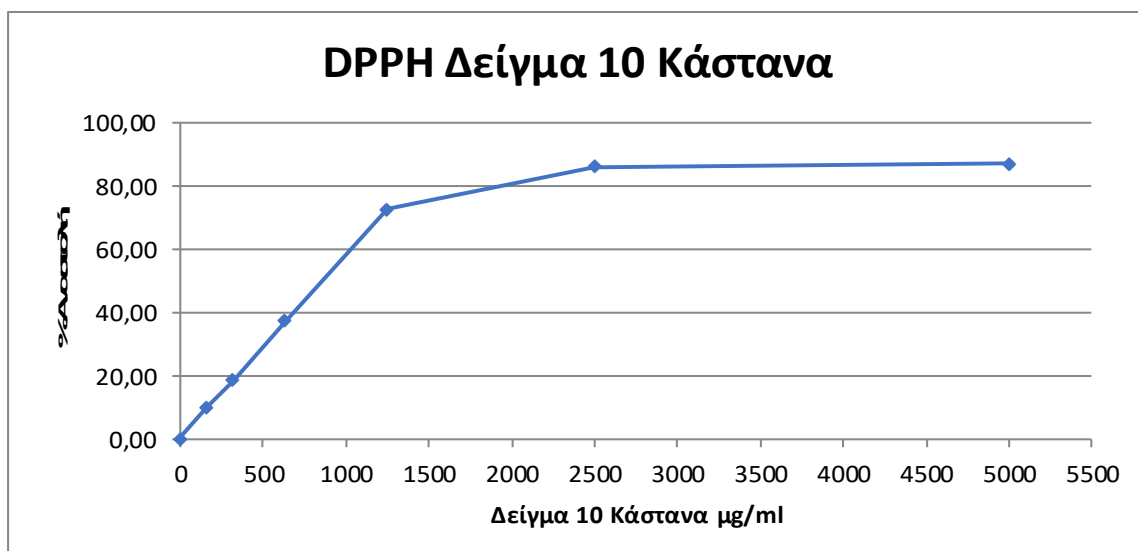
Διάγραμμα 27. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 7 Κάστανα.



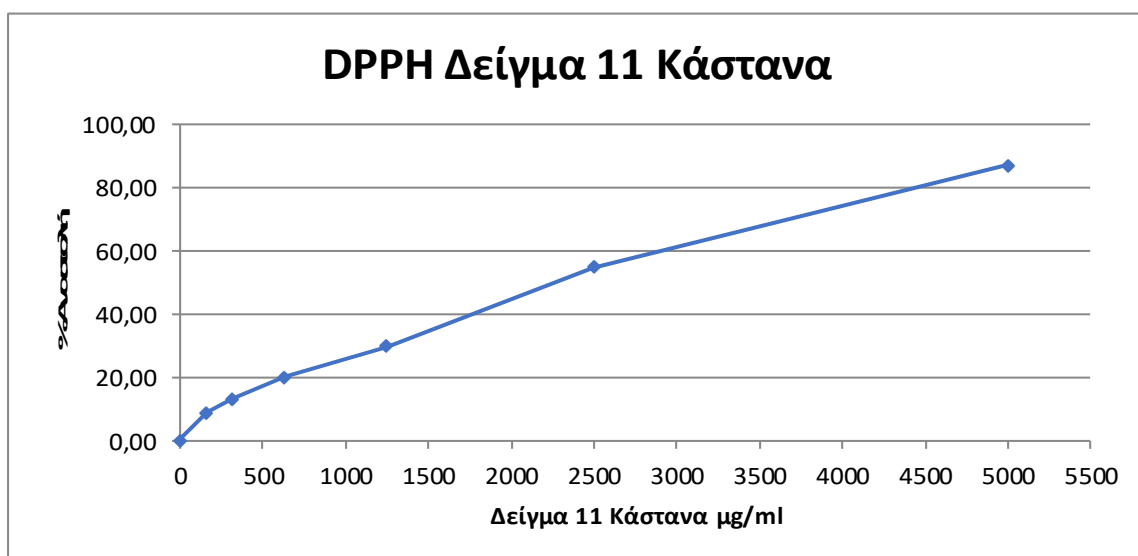
Διάγραμμα 28. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 8 Κάστανα.



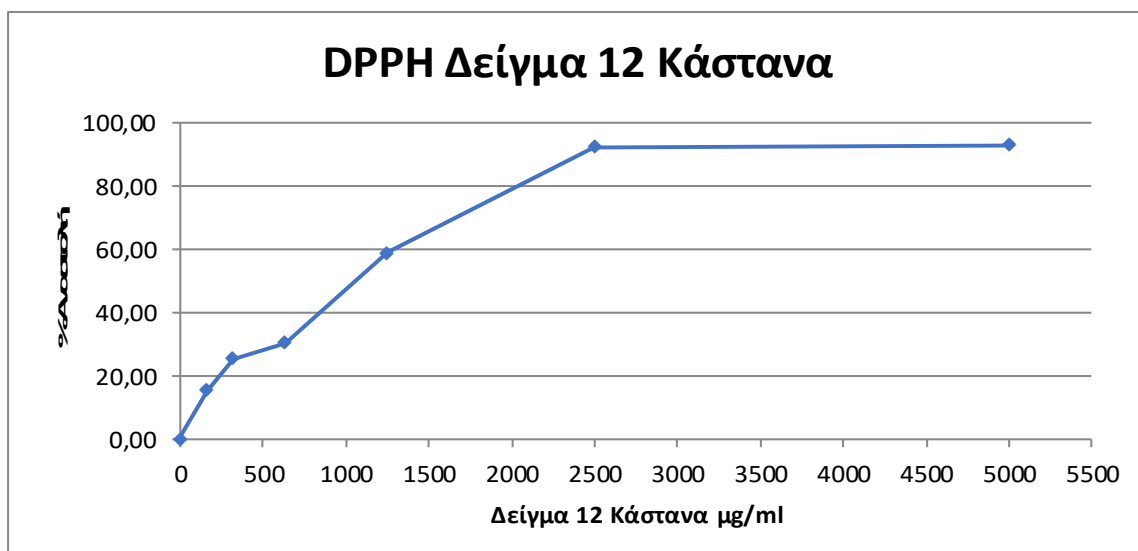
Διάγραμμα 29. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 9 Κάστανα.



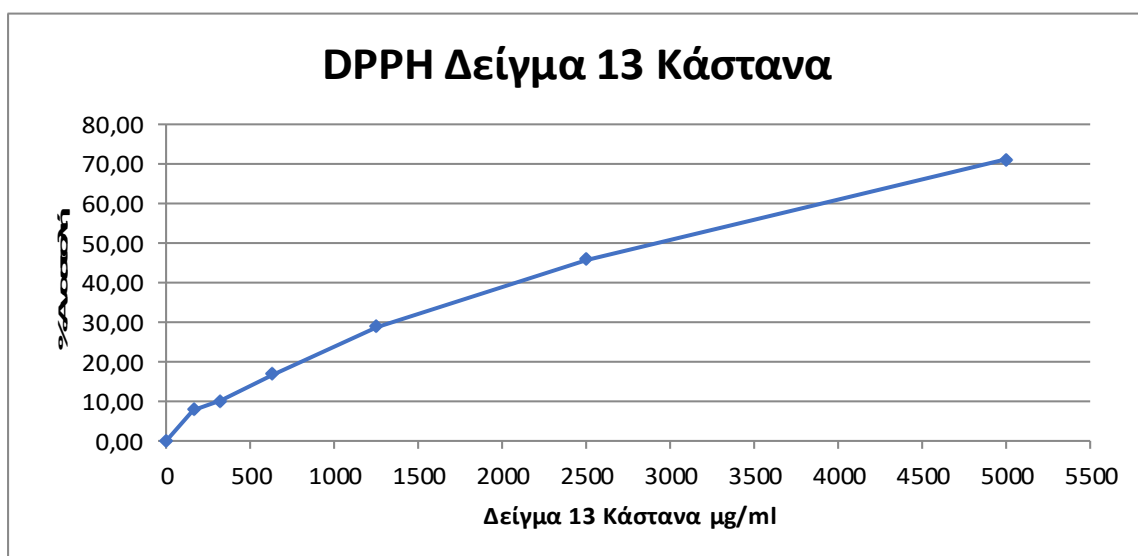
Διάγραμμα 30. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 10 Κάστανα.



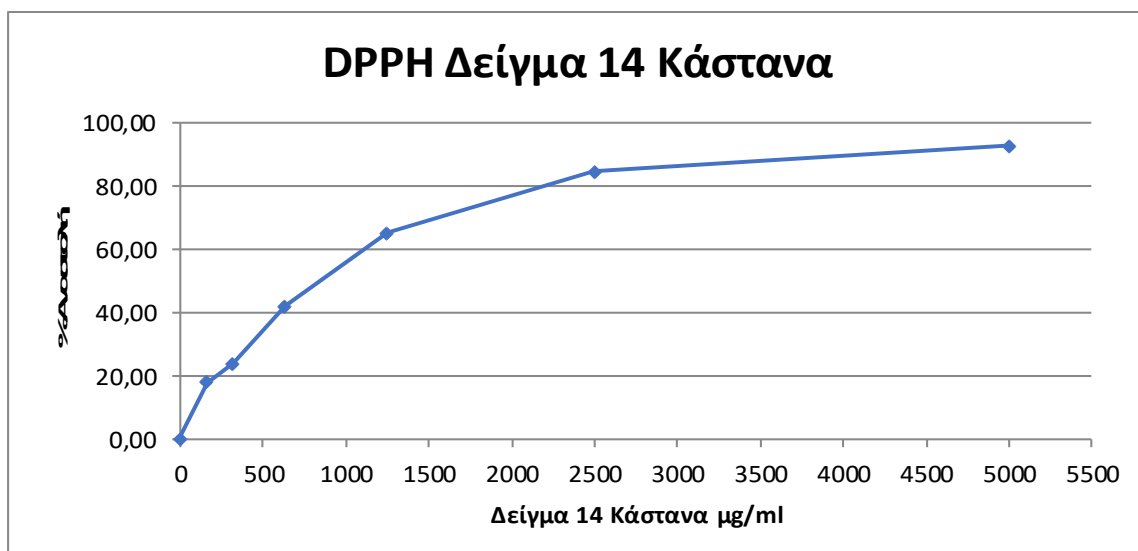
Διάγραμμα 31. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 11 Κάστανα.



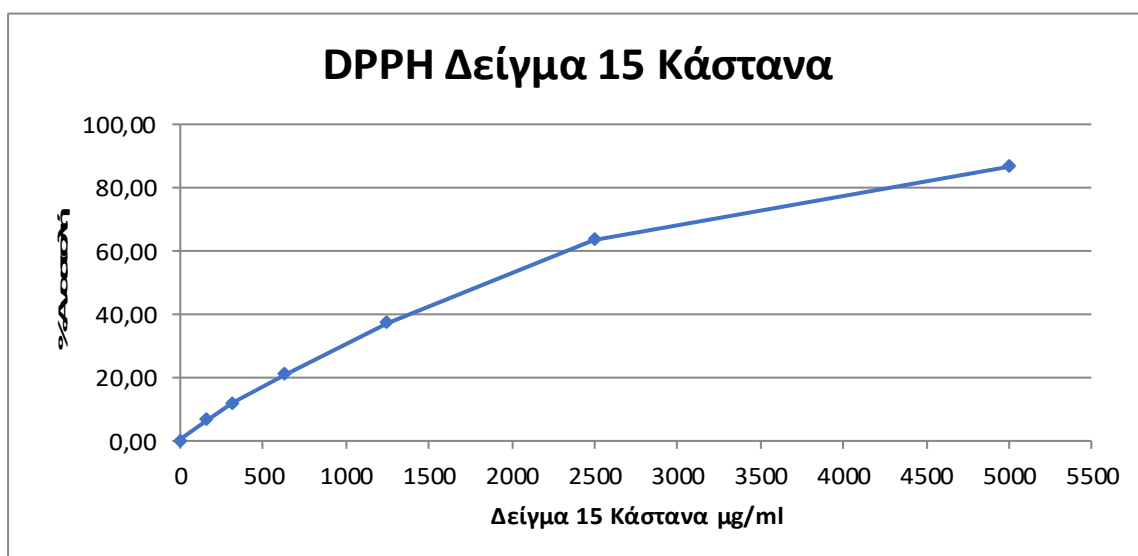
Διάγραμμα 32. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 12 Κάστανα.



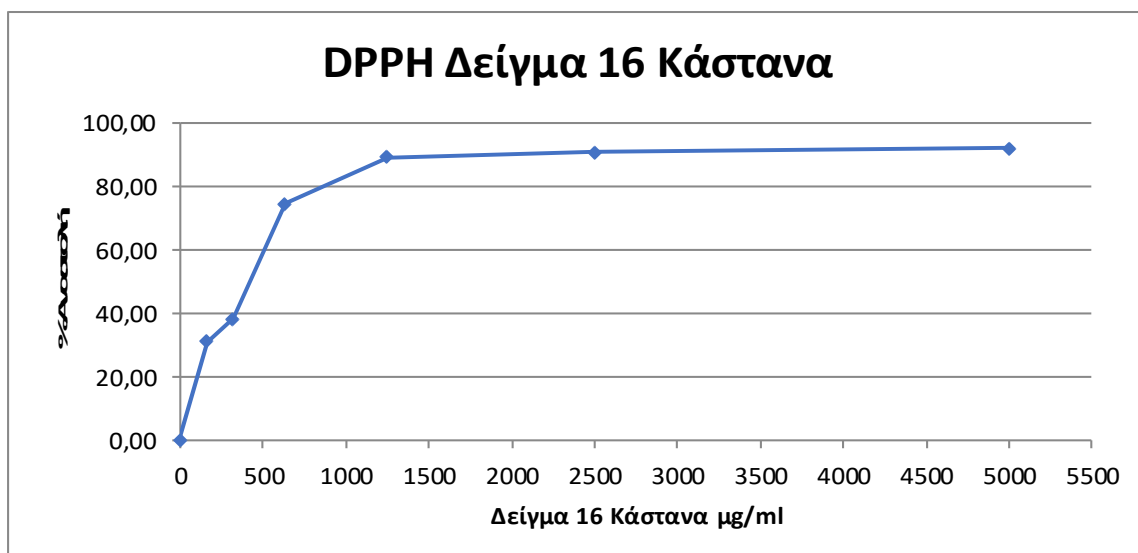
Διάγραμμα 33. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 13 Κάστανα.



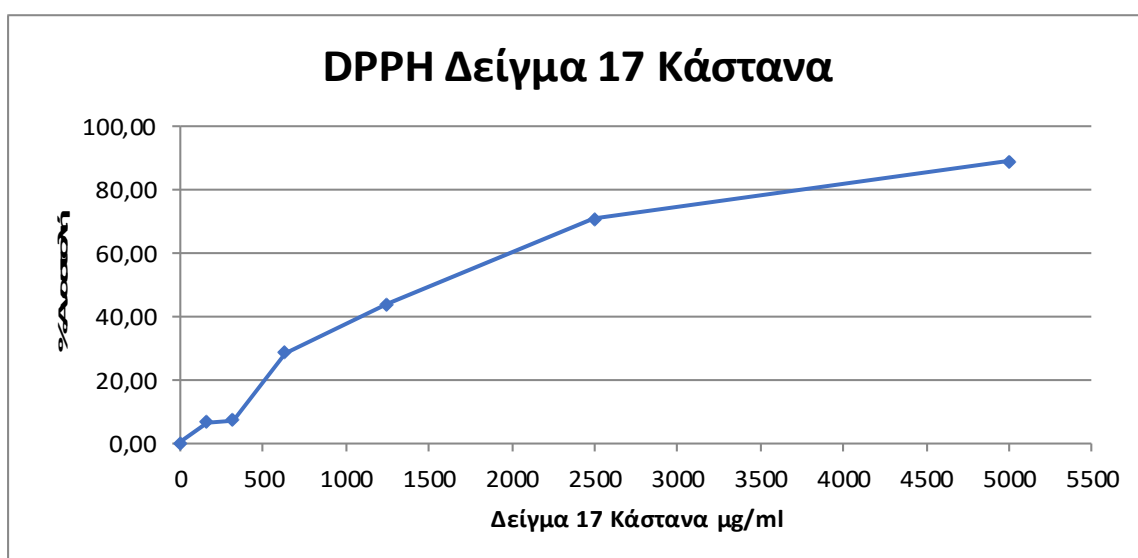
Διάγραμμα 34. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 14 Κάστανα.



Διάγραμμα 35. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 15 Κάστανα.



Διάγραμμα 36. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 16 Κάστανα.



Διάγραμμα 37. Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Δείγμα 17 Κάστανα.

Οι παρατηρούμενες και προβλεπόμενες τιμές ολικού περιεχομένου σε πολυφαινόλες (TPC) και αναστολής ριζών DPPH (εκφρασμένες ως IC₅₀) υπό δεδομένες πειραματικές συνθήκες Box-Behnken και για τα δύο δείγματα παρατίθενται στους Πίνακες 1 και 2.

Πίνακας 1. Τα αποτελέσματα για το ολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες (TPC) και την αναστολή ριζών DPPH (εκφρασμένες ως IC₅₀) υπό δεδομένες πειραματικές συνθήκες Box-Behnken, όσον αφορά τα δείγματα φύλλων καστανιάς.

Δοκιμή	Θ °C	Αναλογία στερεού-υγρού	Χρόνος εκχύλισης	Παρατ. τιμές TPC mg/gr νωπού δείγματος	Προβλ. τιμές TPC mg/gr νωπού δείγματος	Παρατ. τιμές IC ₅₀ DPPH mg/ml	Προβλ. τιμές IC ₅₀ DPPH mg/ml
1	45	0,13	35	9,3118	9,3468	0,550	0,523125
2	45	0,2	10	8,8600	8,9285	0,475	0,491848
3	60	0,13	10	8,5000	9,0273	0,476	0,444670
4	45	0,13	35	9,3118	9,3468	0,565	0,523125
5	45	0,05	10	9,2800	9,0925	0,575	0,583180
6	30	0,13	10	4,5000	4,0917	0,990	0,996303
7	60	0,05	35	9,3400	9,0354	0,550	0,571062
8	45	0,05	60	10,1360	10,0595	0,410	0,394820
9	45	0,13	35	10,0340	9,3468	0,550	0,523125
10	30	0,2	35	3,9800	4,3470	0,850	0,826429
11	45	0,2	60	8,3200	8,5155	0,330	0,320152
12	60	0,13	60	7,7200	8,1283	0,490	0,483697
13	45	0,13	35	9,1290	9,3468	0,570	0,523125
14	30	0,05	35	4,2000	4,7686	1,002	0,987938
15	30	0,13	60	5,9800	5,4527	0,567	0,598330
16	45	0,13	35	9,2109	9,3468	0,490	0,523125
17	45	0,13	35	9,3780	9,3468	0,450	0,523125
18	45	0,13	35	9,1230	9,3468	0,500	0,523125
19	60	0,2	35	8,3800	7,7490	0,550	0,566571
20	45	0,13	35	9,2760	9,3468	0,510	0,523125

Εν συντομία, στα δείγματα φύλλων καστανιάς οι τιμές για το ολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες (TPC) κυμάνθηκαν από 3,98 ως 10,13 mg/gr νωπού δείγματος και για την αναστολή των ριζών DPPH (IC₅₀) κυμάνθηκαν από 0,33 έως 1,00 mg/ml.

Πίνακας 2. Τα αποτελέσματα για το ολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες (TPC) και την αναστολή ριζών DPPH (εκφρασμένες ως IC₅₀) υπό δεδομένες πειραματικές συνθήκες Box-Behnken, όσον αφορά τα δείγματα καρπών καστανιάς

Δοκιμή	Θ °C	Αναλογία στερεού-υγρού	Χρόνος εκχύλισης	Παρατ. τιμές TPC mg/gr νωπού δείγματος	Προβλ. τιμές TPC mg/gr νωπού δείγματος	Παρατ. τιμές IC ₅₀ DPPH mg/ml	Προβλ. τιμές IC ₅₀ DPPH mg/ml
1	45	0,13	35	2,890	3,31660	1,000	1,00600
2	45	0,13	35	3,230	3,31660	1,050	1,00600
3	45	0,13	35	3,480	3,31660	1,070	1,00600
4	45	0,20	60	8,120	7,95771	0,575	0,47293
5	45	0,13	35	3,403	3,31660	0,850	1,00600
6	60	0,13	60	6,780	7,14020	0,475	0,34395
7	60	0,05	35	5,720	5,64300	1,525	1,63587
8	45	0,05	10	6,300	6,43419	1,673	1,76072
9	30	0,13	10	3,750	3,38980	2,725	2,85605
10	30	0,13	60	4,160	4,22128	0,860	1,08134
11	45	0,20	10	2,400	2,68729	2,260	2,26457
12	45	0,13	35	3,580	3,31660	1,065	1,00600
13	30	0,20	35	3,580	3,67692	2,900	2,76097
14	45	0,05	60	4,630	4,37081	0,850	0,85178
15	30	0,05	35	3,800	4,00200	1,860	1,65163
16	60	0,20	35	6,030	5,80808	0,425	0,65153
17	60	0,13	10	4,337	4,27572	1,550	1,32866

Όσον αφορά, τα δείγματα των καρπών της καστανιάς, οι παρατηρούμενες τιμές για το ολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες (TPC) κυμάνθηκαν από 2,4 έως 8,12 mg/gr νωπού δείγματος και για την αναστολή των ριζών DPPH (IC50) από 0,425 ως 2,90 mg/ml.

Οι προβλεπόμενες τιμές προκύπτουν με την επίλυση κάποιων εξισώσεων, οι οποίες εμπεριέχουν ως παραμέτρους τη θερμοκρασία εκχύλισης, την αναλογία φρέσκου δείγματος προς διαλύτη νερού και τον χρόνο εκχύλισης. Στον Πίνακα 3 που παρατίθεται παρακάτω, παρουσιάζονται οι εξισώσεις που σχετίζονται με την ικανότητα αναστολής των ριζών DPPH (εκφραζόμενη ως IC50) και το ολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες (TPC), που προέρχονται από ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης στις πειραματικές μεταβλητές και για τα δύο δείγματα.

Πίνακας 3. Οι εξισώσεις για την πρόβλεψη του ολικού περιεχομένου σε πολυφαινόλες (TPC) και της ικανότητας αναστολής των ριζών DPPH (εκφραζόμενη ως IC50), η οποία προκύπτει από την εφαρμογή πολλαπλής παλινδρόμησης στα πειραματικά δεδομένα με τη χρήση του πακέτου λογισμικού Minitab 17.

No1: Ολικές πολυφαινόλες φύλλων καστανιάς (TPC)	$= 3,542 - 0,10546 A - 2,78 B - 0,00675 C + 0,000885 A*A + 2,33 B*B - 0,000146 C*C + 0,0349 A*B + 0,000291 A*C + 0,0022 B*C$
No2: Ολικές πολυφαινόλες μίγματος καρπών καστανιάς (TPC)	$= 15,19 - 0,1702 A - 85,8 B - 0,2643 C + 0,001911 A*A + 184,5 B*B + 0,001616 C*C + 0,109 A*B + 0,001355 A*C + 0,9778 B*C$
No3: Ικανότητα αναστολής ριζών DPPH (IC50) φύλλων καστανιάς	$= -24,80 + 1,274 A + 19,5 B + 0,0962 C - 0,01188 A*A - 40,6 B*B + 0,000002 C*C - 0,192 A*B - 0,001507 A*C - 0,184 B*C$
No4: Ικανότητα αναστολής ριζών DPPH (IC50) φύλλων καστανιάς	$= 5,39 - 0,1422 A + 11,78 B - 0,0393 C + 0,001630 A*A + 54,6 B*B + 0,000046 C*C - 0,4653 A*B + 0,000527 A*C - 0,1166 B*C$

A, B και C είναι οι κωδικοποιημένες παράμετροι για τη θερμοκρασία εκχύλισης, η αναλογία φρέσκου δείγματος προς διαλύτη νερού και ο χρόνος εκχύλισης, αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η ανάλυση ANOVA για τα TPC και IC₅₀ για τους λειτουργικούς παράγοντες της εκχύλισης με μικροκύματα (στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα $p < 0,05$).

Πίνακας 4. Σημαντικότητα του μοντέλου και κάθε μεταβλητής με βάση την ανάλυση ANOVA για τη συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες TPC και για τη αναστολή ριζών DPPH IC₅₀ από φύλλα καστανιάς και μείγμα καρπών.

No1 TPC (φύλλα)		No2 TPC (καρποί)		No3 IC ₅₀ DPPH (φύλλα)		No4 IC ₅₀ DPPH (καρποί)	
	Επίπεδο σημαντικότητας		Επίπεδο σημαντικότητας		Επίπεδο σημαντικότητας		Επίπεδο σημαντικότητας
Μεταβλητή	<0,0001 ^a	Μεταβλητή	<0,0001 ^a	Μεταβλητή	<0,0001 ^a	Μεταβλητή	<0,0001 ^a
	P value		P value		P value		P value
A	< 0.0001	A	< 0.0001	A	< 0.0001	A	< 0.0001
B	0.232	B	0.756	B	0,050	B	0.685
C	0.054	C	< 0.0001	C	0.090	C	< 0.0001
A*A	< 0.0001	A*A	0.040	A*A	< 0.0001	A*A	0.009
B*B	0.356	B*B	0.001	B*B	0.511	B*B	0.021
C*C	0.996	C*C	0.001	C*C	0.001	C*C	0.788
A*B	0.409	A*B	0.506	A*B	0.084	A*B	0.002
A*C	0.048	A*C	0.023	A*C	< 0.0001	A*C	0.103
C*C	0.199	C*C	< 0.0001	C*C	0.843	C*C	0.076
Έλλειψη Προσαρμογής	Μη σημαντική	Μη σημαντική		Μη σημαντική		Μη σημαντική	
R ²	96,43 %	97,8 %		97,11 %		96,52 %	
Προσαρμοσμένο R ²	93,22 %	94,98 %		94,51 %		92,05 %	

A = Θερμοκρασία εκχύλισης (-1:30°C, 0:45°C, +1:60°C)

B = Αναλογία φρέσκου φυτικού υλικού προς υδατικό διαλύτη (-1:1/20 g/ml, 0:1/12,5 g/ml, +1:1/5 g/ml)

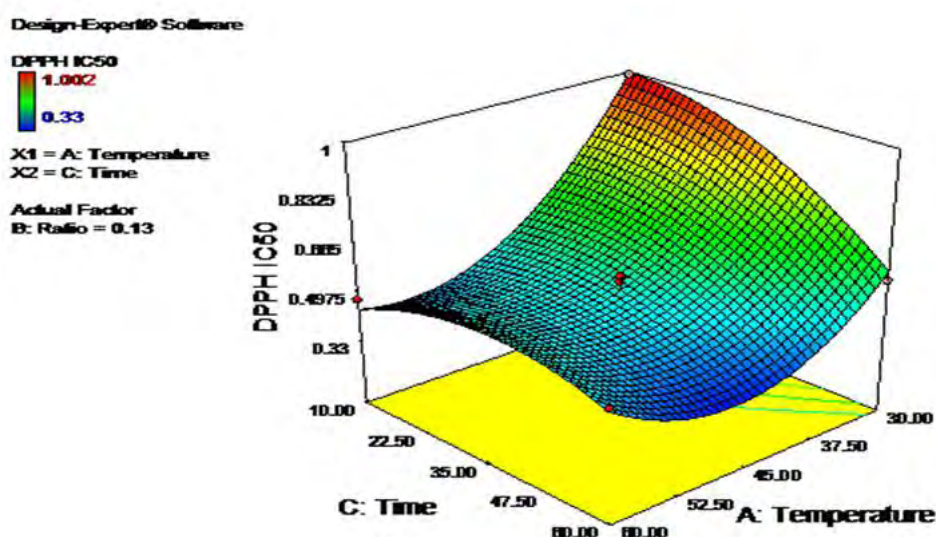
C = Χρόνος εκχύλισης (-1:10min, 0:35min, +1:60min)

^a Σημαντικό ($p < 0,05$), ^b Μη σημαντικό ($p > 0,1$)

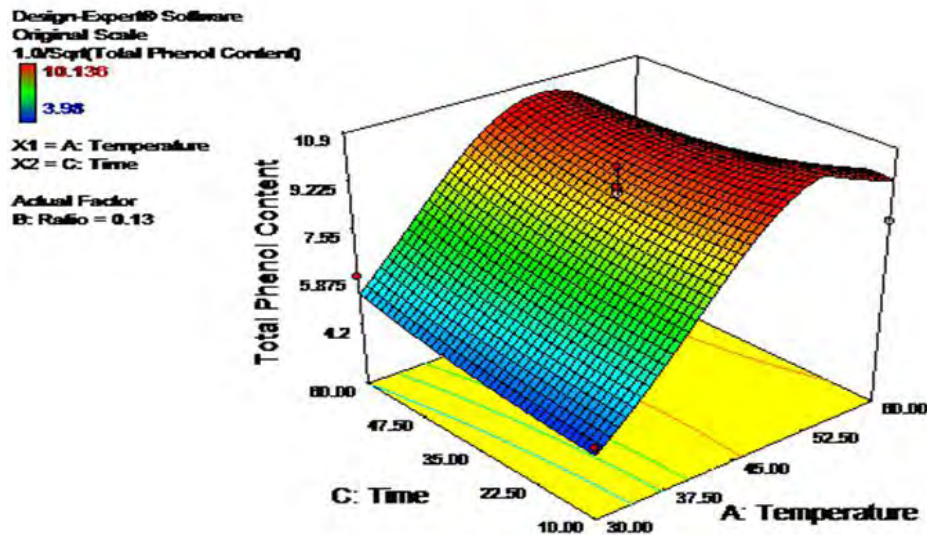
Από τον πίνακα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η θερμοκρασία εκχύλισης, και στις δύο περιπτώσεις, φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τις παρατηρούμενες τιμές p , ο συντελεστής της θερμοκρασίας εκχύλισης ήταν στατιστικά σημαντικός και στις δύο περιπτώσεις. Αντιθέτως, η αναλογία φρέσκου φυτικού υλικού προς υδατικό διαλύτη φαίνεται να είναι ο πλέον στατικά ασήμαντος παράγοντας. Όσον αφορά τον χρόνο εκχύλισης, παρατηρήθηκε

διακύμανση μεταξύ του μείγματος των καρπών και των φύλλων, όπου ήταν στατιστικά σημαντικός και ασήμαντος παράγοντας, αντίστοιχα. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ του R^2 και των προσαρμοσμένων R^2 των λειτουργικών παραγόντων, τόσο στα μείγματα ξηρών καρπών όσο και στα δείγματα φύλλων. Δεδομένου ότι οι υψηλές τιμές υποδεικνύουν καλή απόδοση του μοντέλου, επιτεύχθηκαν τιμές από 96,43% έως 97,8% και για τις δύο μετρήσεις και για τα δύο δείγματα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την καταλληλότητα και την επάρκεια των μοντέλων.

Ακολουθώντας, στις Εικόνες 3.1 και 3.2 απεικονίζεται η επιφάνεια απόκρισης του IC_{50} και του TPC για τα δείγματα φύλλων καστανιάς, μέσω μιας 3D επιφάνειας, ως συνάρτηση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης, ενώ ο λόγος στερεού προς υγρό διατηρήθηκε σταθερός στην κεντρική τιμή. Σε γενικές γραμμές, η αύξηση της θερμοκρασίας από 30°C σε περίπου 49°C οδηγεί σε βέλτιστες τιμές (ελάχιστο για IC_{50} και μέγιστο για TPC), ενώ επιπλέον αυξάνουν τα αποτελέσματα σε αντίθετη κατεύθυνση. Επιπλέον, στο ανώτερο επίπεδο των 60 λεπτών χρόνου εκχύλισης σημαίνονται οι βέλτιστες τιμές και των δύο αποκρίσεων.

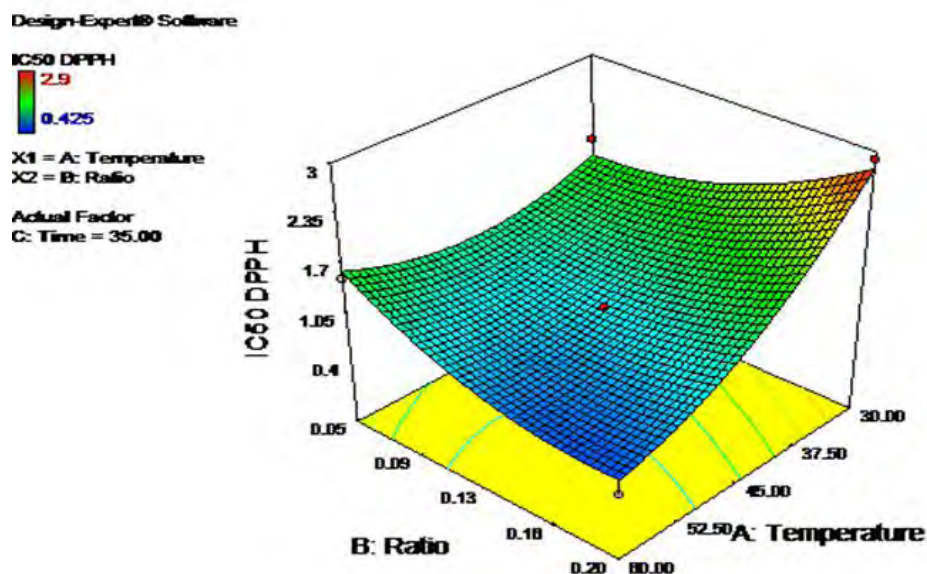


Εικόνα 3.1. Σχέδιο επιφάνειας απόκρισης DPPH IC_{50} , ως συνάρτηση της θερμοκρασίας εκχύλισης και του χρόνου εκχύλισης, για τα φύλλα καστανιάς.

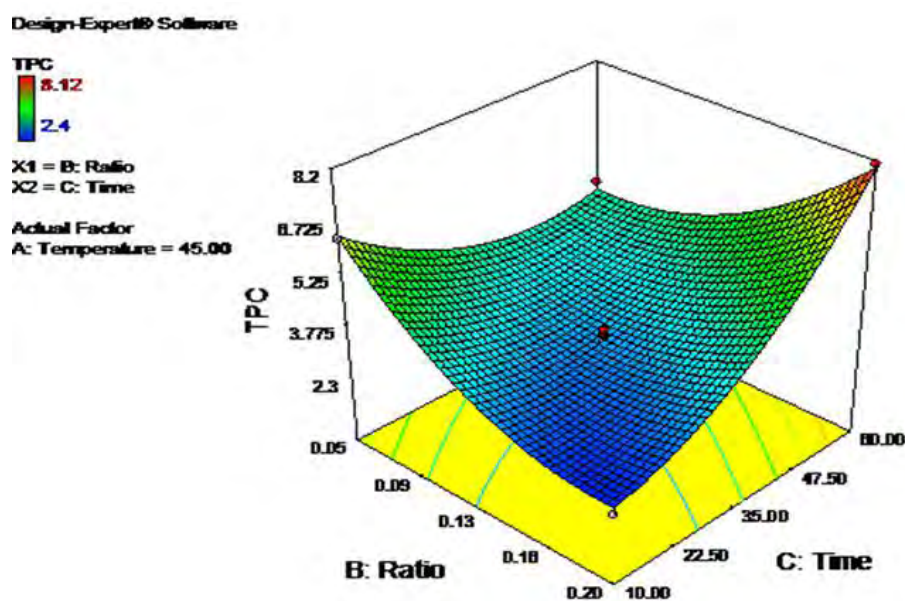


Εικόνα 3.2. Σχέδιο επιφάνειας απόκρισης TPC, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας εκχύλισης και του χρόνου εκχύλισης, για τα φύλλα καστανιάς.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην Εικόνα 3.3., η οποία απεικονίζει την επιφάνεια απόκρισης IC_{50} για τα μείγματα ξηρών καρπών συναρτήσει της θερμοκρασίας εκχύλισης και της αναλογίας στερεού προς υγρό, η αύξηση τόσο της θερμοκρασίας, όσο και της αναλογίας οδηγεί σε επιθυμητή απόκριση ελάχιστης τιμής. Επιπλέον, το Σχήμα 3.4 αντιπροσωπεύει την αλληλεπίδραση μεταξύ του συνολικού περιεχομένου πολυφαινολών και των λειτουργικών παραγόντων αναλογίας και χρόνου εκχύλισης. Όπως γίνεται κατανοητό, σε ανώτερα επίπεδα της αναλογίας και όταν εφαρμόστηκε μεγαλύτερος χρόνος εκχύλισης, το ποσοστό των ληφθέντων πολυφαινολών ήταν υψηλότερο.



Εικόνα 3.3. Σχέδιο επιφάνειας απόκρισης DPPH IC₅₀, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας εκχύλισης και της αναλογίας στερεού φυτικού υλικού προς υδατικό διαλύτη, για τους καρπούς καστανιάς.



Εικόνα 3.4. Σχέδιο επιφάνειας απόκρισης TPC, ως συνάρτηση του χρόνου εκχύλισης και της αναλογίας στερεού φυτικού υλικού προς υδατικό διαλύτη, για τους καρπούς καστανιάς.

Τέλος, στον Πίνακα 5 δίνονται οι προβλεπόμενες και παρατηρούμενες τιμές των αποκρίσεων σε βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, των φύλλων καστανιάς και καρπών.

Πίνακας 5. Προβλεπόμενες και παρατηρούμενες τιμές των αποκρίσεων σε βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, των φύλλων καστανιάς και καρπών.

Ανεξάρτητες Μεταβλητές							
	A	B	C	Προβλεπόμενες Τιμές TPC (mgGAE/gr φρέσκου φυτικού υλικού)	Παρατηρούμενες Τιμές TPC (mgGAE/gr φρέσκου φυτικού υλικού)	Προβλεπόμενες τιμές IC50 DPPH ριζών mg/ml	Παρατηρούμενες τιμές IC50 DPPH ριζών mg/ml
Φύλλα	48,78	1/13,2	60	10,13	10,18	0,37	0,36
Μίγμα Καρπών	60	1/5	60	9,96	9,89	0,40	0,40

[A: θερμοκρασία εκχύλισης (°C), B: αναλογία φρέσκου φυτικού υλικού προς υδατικό διαλύτη (mg/mL), C: χρόνος εκχύλισης (min)].

Κεφάλαιο 4^ο: Συζήτηση

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης διερευνήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για να επιτευχθεί η μέγιστη περιεκτικότητα πολυφαινόλης και η μέγιστη αντιοξειδωτική δράση από τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα φύλλων και καρπών Ευρωπαϊκής Καστανιάς (*Castanea sativa*) με τη χρήση μικροκυμάτων. Τα δείγματα προέρχονταν από καστανιές της περιοχής Μελιβοίας του Ν. Λάρισας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε πιο αποτελεσματική εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων, όπως οι πολυφαινόλες. Πιο αναλυτικά, αυτό παρατηρήθηκε στο σημείο των 48-50°C στην περίπτωση των φύλλων καστανιάς. Επίσης, η απόδοση της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες μειώθηκε όταν η θερμοκρασία έφτασε σε ένα ορισμένο όριο (60°C) στα δείγματα που προέρχονταν από μείγμα καρπών καστανιάς. Αυτό το γεγονός, πιθανόν να συμβαίνει λόγω της διαφορετικής φαινολικής σύνθεσης των προερχόμενων εκχυλισμάτων όταν η εκχύλιση γίνεται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι οι φαινολικές ενώσεις στα δείγματα της καστανιάς επιδεικνύουν μια σχετική σταθερότητα υπό συνθήκες σχετικά υψηλής θερμοκρασίας.

Όσον αφορά τον χρόνο εκχύλισης είναι προφανές ότι όσο μεγαλύτερος ο χρόνος εκχύλισης, τόσο υψηλότερες οι τιμές απόκρισης TPC. Αυτό το φαινόμενο είναι πιο έντονο στην περίπτωση των δειγμάτων μίγματος καρπών καστανιάς από ότι στα δείγματα φύλλων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό πολυμερισμού, διαλυτότητας των πολυφαινολών και αλληλεπίδρασής τους με άλλα συστατικά των εκχυλισμάτων.

Έτσι συγκεντρωτικά, υπό βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας, επιτεύχθηκαν τιμές 0,358 και 0,398 mgGAE/gr νωπού φυτικού υλικού όσον αφορά την περιεκτικότητα σε ολική φαινόλη και 10,176 και 9,89 mg/ml όσον αφορά την ανάλυση DPPH για τα δείγματα φύλλων και καρπών, αντίστοιχα.

Η παρατηρούμενη μη σημαντική στατιστικά επίδραση της αναλογίας των φυτικών υλικών προς τον διαλύτη νερού στο σύστημα εκχύλισης μπορεί να σχετίζεται με την

ισχυρή επίδραση άλλων πειραματικών μεταβλητών που εξετάστηκαν, οι οποίες υπερκάλυψαν την επίδρασή της.

Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους Vazquez et al. (2012), προϊόν δασικών αποβλήτων από την επεξεργασία καστανιάς στη βιομηχανία τροφίμων μελετήθηκε ως πιθανή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Οι εκχυλίσσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας υδατικά διαλύματα μεθανόλης ή αιθανόλης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με έναν σχεδιασμό για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας (25-75 °C), του χρόνου (30-120 λεπτά) και της συγκέντρωσης του διαλύτη (50-90%) στην απόδοση εκχύλισης και στις ιδιότητες εκχύλισης: ολικές πολυφαινόλες, αντιοξειδωτική δράση (χρησιμοποιώντας τις μεθόδους FRAP, DPPH και ABTS) και το μέσο μοριακό βάρος. Όλες οι εξαρτώμενες μεταβλητές επηρεάστηκαν από τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση του διαλύτη ενώ η επίδραση του χρόνου ήταν σχεδόν αμελητέα. Χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης: η υψηλότερη θερμοκρασία που δοκιμάστηκε (75 °C), η χαμηλότερη συγκέντρωση διαλύτη (50%) και ο χρόνος εκχύλισης 75 λεπτών για μεθανολικές εκχυλίσσεις και 30 λεπτών για τα αιθανολικά. Υπό αυτές τις συνθήκες οι προβλεπόμενες τιμές για απόδοση εκχύλισης και συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες ήταν 18,95% και 0,3632 mg GAE/gr εκχυλίσματος για το μεθανολικό εκχύλισμα και 17,95% και 0,2611 mg GAE/gr εκχυλίσματος για τα αιθανολικά. Οι τιμές αυτές είναι παραπλήσιες σε αυτές που βρέθηκαν στο παρόν πείραμα, παρότι οι βέλτιστες συνθήκες δεν συμφωνούν μεταξύ τους.

Σε άλλη έρευνα (Dinis et al., 2012), εξετάστηκαν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες καστανιάς διαφόρων οικοτύπων, με μετρήσεις σε καρπούς του φυτού, Συγκεντρώθηκαν επίσης συνολικά φαινολικά και φλαβονοειδή με τη μέθοδο HPLC. Η συνολική ποσότητα φαινολικών κυμάνθηκε από 0,096 mg/g GAE (θερμός οικοτύπος, Murca) έως 0,194 mg/g GAE (ψυχρότερος οικοτύπος, Valraços). Οι τιμές αυτές κρίνονται χαμηλότερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες του παρόντος πειράματος.

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι η χρήση τεχνικών πράσινης εκχύλισης όπως της χρήσης μικροκυμάτων για την ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων από παραπροϊόντα καλλιέργειας καστανιάς κρίνεται αποτελεσματική. Πρέπει όμως στο μέλλον, τα δραστικά συστατικά του

εκχυλίσματος να απομονωθούν, να ταυτοποιηθούν και να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Βιβλιογραφία

Ξένη Βιβλιογραφία

Ait-Amir B., Pougnet P. and El HamiA., (2015). Meta-Model Development. Embedded Mechatronic Systems 2, Analysis of Failures, Modeling, Simulation and Optimization, 151-179

Alkadi H., (2018). A Review On Free Radicals and Antioxidants. Infect Disord Drug Targets. doi: 10.2174/1871526518666180628124323.

Almeida I.F., Fernandes E., Lima J.L.F.C., Costa P.C. and Bahia M.F., (2008). Protective effect of *Castanea sativa* and *Quercus robur* leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. J Photochem Photobiol B, Biol. 91:87–95.

Almeida I.F., Pinto A.S., Monteiro C., Monteiro H., Belo L., Fernandes J., Bento A.R., Duarte T.L., Garrido J., Bahia M.F. et al., (2015). Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. J Photochem Photobiol B, Biol. 144:28–34.

Ashok B.T. and Ali R., (1999). The aging paradox: free radical theory of aging. Exp Gerontol., 34(3):293-303

Bagchi K. and Puri S., (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. East Mediterranean Health Jr., 4:350–60.

Barreira J.C. M., Ferreira I.C.F.R., Oliveira M.B.P.P. and Pereira J.A., (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food Chemistry, 107(3), 1106–1113.

Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Huđek A., Bačun-Družina V. and Komes D., (2018). Overview of polyphenols and their properties. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications, 3–44. doi:10.1016/b978-0-12-813572-3.00001-4

Beta T. and Duodu K. G., (2016). Bioactives: Antioxidants. Reference Module in Food Science. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.00110-4

Betteridge D.J., (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49(2): 3-8.

Bimakr M., Abdul Rahman R., Taip F.S., Adzahan N.M., Sarker M.Z.I. and Ganjloo A., (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasahispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. *Molecules* 17: 11748–11762.

Blomhoff R., Carlsen M. H., Andersen L. F. and Jacobs D. R., (2006). Health benefits of nuts: Potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition*, 96(2), S52–S60.

Braga N., Rodrigues F. and Oliveira MB., (2015). *Castanea sativa* by-products: a review on added value and sustainable application. *Nat Prod Res.* 29:1–18.

Cao G., Alessio H. and Cutler R, (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants". *Free Radic Biol Med.* 14 (3): 303–11. doi:10.1016/0891-5849(93)90027-R. PMID 8458588.

Ceksteryte V., Kazlauskas S. and Racys J., (2006). Composition of flavonoids in Lithuanian honey and beebread. *Biologija*, 2, 28–33.

Cerulli A., Masullo M., Mari A., Balato A., Filosa R., Lembo S., Napolitano A. and Piacente S., (2017). Phenolics from *Castanea sativa* leaves and their effects on UVB-induced damage, *Natural Product Research*, DOI:10.1080/14786419.2017.1331225

Chattopadhyay A., Choudhury T.D., Bandyopadhyay D. and Datta A.G., (2000). Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochemical Pharmacology* 59, 419–425.

Chaudhuri S., Banerjee A., Basu K., Sengupta B. and Sengupta P.K., (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* 41, 42–48.

Cheeseman K.H. and Slater T.F., (1993). An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull.*, 49:481–93.

Chen, X.P.; Wang, W.X.; Li, S.B.; Xue, J.L.; Fan, L.J.; Sheng, Z.J.; Chen, Y.G. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells. *Carbohydr. Polym.* 2010, 80, 944–948.

Chen X.P., Wang W.X., Li S.B., Xue J.L., Fan L.J., Sheng Z.J. and Chen Y.G., (2010). Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells. *Carbohydr. Polym.*, 80: 944–948.

Devasagayam T.P., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S. and Lele R.D., (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.*, 52:794-804

Dinis L.-T., Ferreira-Cardoso J., Peixoto F., Costa R. and Gomes-Laranjo J., (2011). Study of morphological and chemical diversity in chestnut trees (var. “Judia”) as a function of temperature sum. *CyTA – Journal of Food*, 9(3), 192–199.

Dinis L.-T., Oliveira M.M., Almeida J., Costa R., Gomes-Laranjo J. and Peixoto F., (2012). Antioxidant activities of chestnut nut of *Castanea sativa* Mill. (cultivar ‘Judia’) as function of origin ecosystem. *Food Chemistry* 132, 1–8

Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M. and Barros L., (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal. *Food Chemistry*, 100, 1511–1516.

Gagaoua Mohammed, (2018). Aqueous Methods for Extraction/Recovery of Macromolecules From Microorganisms of Atypical Environments: A Focus on Three Phase Partitioning. Chapter 8. *Methods in Microbiology*. 203-242

Gordon M.H. and Roedig-Penman A., (1998). Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 97, 79–85.

- Hooper L., Kroon P.A., Rimm E.B., Cohn J.S., Harvey I., Cornu K. A. L. et al., (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 38–50.
- Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C.B. and Rahu N., (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1–9.
- Ikawa M., Schaper T.D., Dollard C.A. and Sasner J.J., (2003). Utilization of Folin–Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (7): 1811–5.
- Jaeschke H. and Ramachandran A., (2018). Antioxidant Defense Mechanisms. *Comprehensive Toxicology*, 277–295. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.64200-9
- Kedare S.B. and Singh R.P., (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.*, 48(4): 412–422.
- Kenjeric D., Manic M., Primorac L., Bubalo D. and Perl A., (2007). Flavonoid profile of Robinia honeys produced In Croatia. *Food Chemistry*, 102, 683–690.
- Krinsky N.I., (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 200(2):248-54.
- Li T., Qua X.Y., Zhang A.A. and Wang Z.Z., (2012). Ultrasound-assisted extraction and profile characteristics of seed oil from *Isatisindigotica* fort. *Ind. Crop. Prod.*, 35: 98–104.
- Liu T., Stern A. and Roberts L.J., (1999). The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed Sci.*, 6:226–35.
- Lobo V., Patil A., Phatak A. and Chandra N., (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.*, 4(8): 118–126.
- McCord J.M., (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.*, 108:652–9.

NCI Dictionary of Cancer Terms, National Cancer Institute at the National Institutes of Health.

Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K. and van Leeuwen P.A.M., (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74, 418–425.

Niki E., (1993). Antioxidant defenses in eukaryotic cells. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, editors. *Free radicals: From basic science to medicine*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 365–373.

Ozgova S., Hermanek J. and Gut I., (2003). Different antioxidant effects of polyphenols on lipid

peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochemical Pharmacology* 66, 1127–1137.

Rao J.S. and Kumar B., (2012). 3D Blade root shape optimization. 10th International Conference on Vibrations in Rotating Machinery

Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G.G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933–956.

Samaram S., Mirhosseini H., Tan C.T. and Ghazali H.M., (2013). Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) and Solvent Extraction of Papaya Seed Oil: Yield, Fatty Acid Composition and Triacylglycerol Profile. *Molecules*. 18: 12474-12487, doi:10.3390/molecules181012474

Sánchez-Moreno, C., 2002. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación: presencia en alimentos y consumo: biodisponibilidad y metabolismo. *Alimentaria* 329, 19–28.

Shi H., Noguchi N. and Niki E., (1999). Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.*, 27(3-4):334-46.

Singleton V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventós R.M., (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin–ciocalteu reagent. 299: 152.

Srdić-Rajić A. and Ristić K., (2016). Antioxidants: Role on Health and Prevention. Encyclopedia of Food and Health, Pages 227-233

Twilley D. and Lall N., (2014). African Plants with Dermatological and Ocular Relevance. Toxicological Survey of African Medicinal Plants, 493–512. doi:10.1016/b978-0-12-800018-2.00016-9

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. and Telser J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol., 39(1):44-84.

van Acker F.A.A., Schouten O., Haenen G.R.M.M., van der Vijgh W.J.F. and Bast A., (2000). Flavonoids can replace alpha-tocoferol as an antioxidant. FEBS Letters 473, 145–148.

Vinatoru M., Mason T.J. and Calinescu I., (2017). Ultrasonically Assisted Extraction (UAE) and Microwave Assisted Extraction (MAE) of Functional Compounds from Plant Materials. Trends in Analytical Chemistry, 97: 159-178

Wagner Jr. J.R., Mount E.M., and Giles Jr. H., (2014). 25 - Design of Experiments. Extrusion (Second Edition). The Definitive Processing Guide and Handbook. Plastics Design Library, 291-308

Zivkovic J., Zekovic Z., Mujic I., Tumbas V., Cvetkovic D. and Spasojevic I., (2009). Antioxidant Properties of Chestnut Phenolics, Food Technol. Biotechnol. 47 (4) 421–427

Ελληνική Βιβλιογραφία

McMurry J., (2017). *Οργανική Χημεία*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (ΠΕΚ)

Taiz L. and Zeiger E., (2013). *Φυσιολογία Φυτών*. 5^η Αμερικανική- 1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις Utopia

Θεριός Ι.Ν. και Δημασή- Θεριού Κ., (2013). *Ειδική Δενδροκομία: Φυλλοβόλα Οπωροφόρα Δένδρα*. 1^η Έκδοση, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

Κλώνης Ι., (2006). *Ενζυμολογία*. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα, Ελλάδα

Μαρμαράς Β. και Λαμπροπούλου- Μαρμαρά Μ., (2005). *Βιολογία Κυττάρου: Μοριακή Προσέγγιση*. 5^η Έκδοση, Εκδόσεις Τυποrama, Πάτρα, Ελλάδα

Ιστοσελίδες

Engineering Statistics Handbook, (2012). NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/index.htm>